

Spontane Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Haushuhn

von

Lisa Verena Fenzl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Spontane Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Haushuhn

von Lisa Verena Fenzl
aus München

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Hühner in der Immunologie	2
2.1.1	Bedeutung von Hühnern für die Forschung	2
2.1.2	Hühner in der Immunologie – historisch	2
2.1.3	Hühner in der Immunologie – aktuell.....	3
2.2	T-Zellen.....	5
2.2.1	Einteilung der T-Zellen	5
2.2.2	Unterschiede zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	5
2.3	$\gamma\delta$-T-Zellen im Säuger	6
2.3.1	Vorkommen	6
2.3.2	$\gamma\delta$ -T-Zellentwicklung im Säuger.....	7
2.3.3	Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Säuger.....	8
2.3.4	Struktur des $\gamma\delta$ -TCRs im Säuger	10
2.4	$\gamma\delta$-T-Zellen im Huhn	11
2.4.1	Vorkommen	11
2.4.2	$\gamma\delta$ -T-Zellentwicklung im Huhn	12
2.4.3	Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn.....	13
2.4.4	Struktur des $\gamma\delta$ -TCRs im Huhn	14
2.5	Zytotoxizität	17
2.5.1	Zytotoxizität bei Säuger-NK-Zellen.....	17
2.5.2	Zytotoxizität bei Säuger- $\gamma\delta$ -T-Zellen	17
2.5.3	Zytotoxizität bei Hühner-NK-Zellen	18
2.5.4	Zytotoxizität bei Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	19
3	ZIELSETZUNG.....	20
4	PUBLIKATION.....	21
5	DISKUSSION.....	30
6	ZUSAMMENFASSUNG	39
7	SUMMARY	40
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	41
9	DANKSAGUNG	54

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut adulter Individuen	7
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des $\gamma\delta$ -TCR-CD3-Komplexes	15
Abbildung 3: Schema der TCR-Genloci des Haushuhns.....	16
Abbildung 4: MHCI-unabhängige Zytotoxizität	33
Abbildung 5: Einfluss des mAks 20E5 auf die Zytotoxizität	35

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity determining region
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CMV	Cytomegalie-Virus
CRTAM	Cytotoxic and regulatory T-cell molecule
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
D	Diversity
DETC	Dendritic epidermal T cell
ED	Embryonic day
FasL	Fas-Ligand
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylpyrophosphat
IEL	Intraepithelial lymphocyte
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
J	Junctional
LAK	Lymphokine-activated killers
LSCC	Leukosis/sarcoma virus group chicken cell line
mAk	Monoklonaler Antikörper
MDCC	Marek's disease virus chicken cell line
MHC	Major histocompatibility complex
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle

PBL	Peripheral blood lymphocyte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PI	Propidiumiodid
PKH67	Paul Karl Horan-Farbstoff 67
REV	Retikuloendotheliose-Virus
sp.	Spezies
TCR	T cell receptor
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
T _H	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAILR	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
V	Variable
WC1	Workshop cluster 1

1 EINLEITUNG

B- und T-Lymphozyten sind die Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie verfügen jeweils über ein hochvariables Antigen-Rezeptor-Repertoire. Die T-Zellen lassen sich anhand ihrer T-Zell-Rezeptor-Struktur in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilen; in welchem Verhältnis zueinander die beiden Untergruppen vorliegen ist spezies-, alters- und gewebeabhängig. Während zu Bedeutung und Funktionen von B-Zellen und $\alpha\beta$ -T-Zellen in den letzten 60 Jahren bereits vieles erforscht wurde, fehlen bislang Erkenntnisse über die genauen Fähigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie eine Erklärung für deren evolutionäre Co-Entwicklung mit den $\alpha\beta$ -T-Zellen. Das rührt unter anderem daher, dass die klassischen Untersuchungsmodelle der Immunologie Maus und Mensch sind, diese aber nur relativ wenige $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen. Im Gegensatz zu Mäusen und Menschen haben Hühner (*Gallus gallus*) eine vergleichsweise hohe $\gamma\delta$ -T-Zell-Frequenz [1] und bieten sich deshalb als Modell zur genaueren Untersuchung der Funktionen und Fähigkeiten dieser Zellen an.

Da Pathogene, wie Viren und Bakterien, auch intrazellulär vorliegen können und somit für die Antikörper der B-Zellen nicht direkt zugänglich sind bzw. Tumorzellen so zum Teil nicht erkannt werden können, benötigt das Immunsystem hierfür eine andere Abwehrstrategie. Diese wird angewendet durch NK-Zellen sowie zytotoxische T-Zellen, indem sie infizierte oder veränderte körpereigene Zellen erkennen und gezielt abtöten können. Im Säuger wird diese Zytotoxizität auch durch NK-Zellen vermittelt, wohingegen im Huhn - abgesehen vom intestinalen Epithel - kaum NK-Zellen in lymphoidem Gewebe wie z.B. im Blut, der Milz oder der Lunge nachzuweisen sind [2, 3]. Es kann allerdings vermutet werden, dass diese Aufgabe im Huhn von den vermehrt vorhandenen $\gamma\delta$ -T-Zellen übernommen wird, da diese im Säuger in *in vitro* Studien zytotoxische Eigenschaften zeigten [4, 5].

$\gamma\delta$ -T-Zellen spielen beim Säuger eine wichtige Rolle in der „first line of defense“, da sie vor allem in epithelreichen Barriere-Geweben zu finden sind und hier auf eindringende Pathogene treffen [6, 7]. Verschiedene Aspekte ihrer Funktionsweise sowie ihre möglichen Liganden blieben aber bislang auch im Bereich der Geflügelimmunologie ungeklärt. Da unsere Arbeitsgruppe vor kurzem ein Langzeit-Kultivierungssystem für Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen etabliert hat, können nun insbesondere die zytotoxischen Fähigkeiten dieser Zellen und deren Rolle im Haushuhn näher untersucht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 HÜHNER IN DER IMMUNOLOGIE

2.1.1 Bedeutung von Hühnern für die Forschung

Geflügel hat eine enorme wirtschaftliche Bedeutung. Allein in Deutschland werden jährlich über 660 Millionen Hühner geschlachtet (Jahr 2015) [8]. Das entspricht einem Pro-Kopf-Verbrauch an Geflügelfleisch von 19,1 kg; gleichzeitig werden jedes Jahr im Durchschnitt 227 Eier pro Kopf verzehrt (2014) [9]. Daraus ergibt sich insgesamt ein jährlicher Umsatz von ca. 10 Milliarden Euro in der Geflügelindustrie [10]. Hühner werden in Deutschland größtenteils in intensiven Haltungsformen gehalten; um die dabei auftretenden hohen Tierzahlen auf geringem Raum möglichst gesund zu erhalten und gleichzeitig wirtschaftlich erfolgreich Geflügelwaren produzieren zu können, ist eine umfassende Forschung in vielen Bereichen notwendig.

Neben dem wirtschaftlichen Aspekt ist die Geflügelgesundheit auch für den Schutz der Bevölkerung vor Zoonosen entscheidend. Beispielsweise waren in den letzten Jahren in Deutschland in mehreren Wellen Geflügelbetriebe und Wildvögel von der sogenannten „Vogelgrippe“, also der Geflügelpest, ausgelöst durch das aviäre Influenzavirus H5N8, betroffen [11, 12]. Nur das exakte Verständnis der Pathologie und der Übertragungswege ermöglicht eine sinnvolle Prophylaxe sowie im Ausbruchsfall die Bekämpfung dieser Erkrankungen.

Antibiotikaresistenzen nehmen heutzutage rapide zu und stellen einen großen Risikofaktor für die menschliche und tierische Gesundheit dar [13]. Häufig wird hierfür auch der teilweise prophylaktische bzw. metaphylaktische Antibiotikaeinsatz in der Nutztier-Industrie verantwortlich gemacht [14], sodass im Bereich der Bakteriologie, der Epidemiologie und der Immunologie verschiedene Strategien zur Senkung des Antibiotikaeinsatzes entwickelt werden. Auch hierbei spielen Hühner eine wichtige Rolle als Versuchs- und Modelltiere.

2.1.2 Hühner in der Immunologie – historisch

Das Immunsystem der Vögel eignet sich gut um grundsätzliche Mechanismen der Immunantwort bei Wirbeltieren zu erforschen, da sich Säugetiere und Vögel vor rund

300 Millionen Jahren aus dem gleichen reptilienartigen Vorfahren entwickelt haben und sich daher viele Facetten ihres Immunsystems teilen. Entscheidender Vorteil der Forschung im Geflügel gegenüber der im Säugetier war der einfache Zugang zu allen embryologischen Stadien im Ei. Einige der im Vogel gewonnenen Erkenntnisse wurden erst später auf den Säuger übertragen. Aufgrund der enormen wirtschaftlichen Bedeutung und der Verfügbarkeit von Inzuchtlinien erfolgte ein Großteil der aviären immunologischen Forschung im Haushuhn, *Gallus gallus domesticus* [15].

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erforschte James Murphy Tumorwachstum und -abwehr in adulten Hühnern und Hühnerembryos [16] und entdeckte so die Bedeutung der Lymphozyten bei der Abwehr von transplantiertem Fremdgewebe sowie beim Schutz vor Infektionen. Allerdings wurde den Ergebnissen seiner Forschungen damals wenig Aufmerksamkeit geschenkt, sodass die Lymphozyten erst in den 1950ern „wiederentdeckt“ wurden [17]. Auch die Rolle der B-Lymphozyten für die Produktion von Antikörpern, bzw. die Bursa fabricii als Ort ihrer Differenzierung wurde im Huhn entdeckt [18]. Dass ein Äquivalent dazu im Säuger aufgrund der Ähnlichkeit der lymphoiden Gewebe zwischen Säuger und Geflügel existieren müsste, wurde ersichtlich [19] und später im Knochenmark entdeckt. Entscheidende Erkenntnisse bei der Entwicklung von Impfungen stammen aus Forschungen im Huhn. Nachdem Edward Jenner Ende des 18. Jahrhunderts das Prinzip der Vakzination mit Lebendimpfstoffen durch Versuche mit Kuhpocken erkannte, entdeckte Louis Pasteur fast hundert Jahre später größtenteils zufällig den Effekt von attenuierten Vakzinen bei Untersuchungen von *Pasteurella multocida* in Hühnern [20].

2.1.3 Hühner in der Immunologie – aktuell

Im Jahr 2004 wurde das Hühner-Genom als erstes „Nicht-Säuger“-Genom komplett sequenziert und veröffentlicht [21]. Das bietet einen neuen Blickwinkel auf die Genomentwicklung der Vertebraten und verbessert zudem die Möglichkeiten der Annotierung von Säugergenomen.

In der Weiter- bzw. Neuentwicklung von Vakzinen spielen Hühner durch die leichte Zugänglichkeit zu allen embryologischen Stadien auch heute noch eine große Rolle. Die Idee, Individuen schon vor der Geburt bzw. des Schlüpfens immunisieren zu können, um postnatal über ein möglichst abwehrfähiges Immunsystem zu verfügen, wurde an Hühnern realisiert [22]. So können beispielsweise Lege- und Masthühner mit einer

in ovo-Impfung gegen den Marek-Virus am ED18 durch Vakzinierungs-Maschinen geschützt werden.

Die Gesunderhaltung großer Bestände zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit in der Geflügelindustrie sowie der Schutz der Bevölkerung vor Zoonosen sind wichtige Themen der immunologischen Forschung. Obwohl das Immunsystem des Haushuhns das am besten untersuchte einer Nicht-Säuger-Spezies ist [15], besteht dennoch unbedingter Forschungsbedarf im Bereich der Grundlagenforschung, da viele Fragen - zum Beispiel die genaue Funktionsweise der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Geflügel - noch ungeklärt sind.

2.2 T-ZELLEN

2.2.1 Einteilung der T-Zellen

T-Lymphozyten lassen sich funktionell in T-Helfer-Zellen (T_H), zytotoxische T-Zellen (CTL) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) einteilen. Alle T-Zellen sind CD3 positiv auf ihrer Oberfläche. T-Helfer-Zellen sind zusätzlich CD4 positiv und sezernieren Zytokine um Immunreaktionen zu modulieren. CTLs hingegen sind CD8 positiv und haben zytotoxische Eigenschaften gegenüber Zielzellen. T_{reg} sind ebenfalls CD4 positiv, zudem exprimieren sie den Transkriptionsfaktor FoxP3. Sie schützen den Körper vor überschießenden Immunreaktionen indem sie regulierend auf das Immunsystem einwirken. Auf T-Zell-Rezeptor-Ebene ist eine Unterscheidung in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich [23]. Über die Funktion der $\alpha\beta$ -T-Zellen ist vor allem beim Säuger schon vieles bekannt, $\gamma\delta$ -T-Zellen dagegen sind sowohl beim Säuger als auch beim Huhn funktionell in weiten Bereichen noch nicht charakterisiert.

2.2.2 Unterschiede zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen haben den gleichen Vorläufer aus dem Knochenmark, erst während der Entwicklung im Thymus werden sie unterscheidbar durch die verschiedenen Ketten aus denen sich ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) zusammensetzen. Zwar teilen sich $\gamma\delta$ -T-Zellen viele Oberflächen-Proteine und einige Effektorfunktionen – wie die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität – mit den $\alpha\beta$ -T-Zellen, dennoch gibt es große Unterschiede zwischen den beiden T-Zell-Subpopulationen.

Je nach Tierart unterscheidet sich die Frequenz mit der die jeweiligen T-Zell-Subpopulationen vorliegen: es gibt $\gamma\delta$ -TCR-low und $\gamma\delta$ -TCR-high Spezies. Die Ursache der speziesspezifischen Unterschiede ist noch nicht geklärt. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind nicht zwangsläufig auf eine Antigenprozessierung oder deren Präsentation durch einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) angewiesen um aktiviert zu werden, $\alpha\beta$ -T-Zellen hingegen schon [24, 25]. Sie können im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen auch lösliche Proteine und Nicht-Peptid-Verbindungen erkennen [26]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Anzahl der Genvarianten, die für den Vorgang der somatischen Rekombination der jeweiligen Ketten zur Verfügung steht [27], und in der Diversität der theoretisch möglichen Rezeptorvarianten, wobei die $\gamma\delta$ -T-Zellen die größere aufweisen [28].

2.3 $\gamma\delta$ -T-ZELLEN IM SÄUGER

2.3.1 Vorkommen

$\gamma\delta$ -T-Zellen präsentieren zusammen mit $\alpha\beta$ -T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK) und B-Zellen die vier Varianten an Lymphozyten, die in allen bislang untersuchten Vertebraten vorkommen, mit Ausnahme der Agnatha [6, 28]. Daraus lässt sich schließen, dass jede dieser vier für die Ausbildung einer vollständigen Immunkompetenz notwendig ist. Nachdem B-Zellen bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts [18] und $\alpha\beta$ -T-Zellen Anfang der 1980er-Jahre identifiziert wurden [29, 30], charakterisierten Brenner et. al. 1986 eine zweite Population von T-Zellen. Dabei wurden T-Zellen in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) gefunden, die mit dem Antikörper CT-3 [31] detektiert werden konnten, die aber durch die bis dato bekannten Antikörper gegen die α - bzw. β -Kette der T-Zell-Rezeptoren nicht ansprechbar waren [23]. Diese CT-3 positiven $\alpha\beta$ negativen T-Zellen sind die $\gamma\delta$ -T-Zellen.

0,5 bis 16% der CD3 positiven Zellen im Blut von Erwachsenen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen, wobei der Durchschnitt bei 4% liegt. Ebenso wenige sind in den lymphatischen Organen zu finden, es scheint kein Tropismus speziell für das Epithel zu geben [6, 32, 33]. In adulten Mäusen machen $\gamma\delta$ -T-Zellen 1 bis 4% der gesamten T-Zellen im Thymus und den sekundären lymphatischen Organen aus, auch in der Lunge liegen wenige $\gamma\delta$ -T-Zellen vor. Dagegen tragen 10-20% der T-Zellen im Reproduktionstrakt, bzw. 20-40% der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) und 50-70% der T-Zellen in der Haut den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor [34]. Besonders auffällig sind dabei die dendritic epidermal T cells (DETCs), die alle einen identischen $\gamma\delta$ -TCR exprimieren [35]: V γ 5V δ 1 [36].

Im Gegensatz zum Menschen und der Maus, die beide zu den Spezies mit einer niedrigen $\gamma\delta$ -T-Zell-Frequenz gehören, haben Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen einen wesentlich höheren Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen. Im adulten Rind sind 20-40% der T-Zellen des peripheren Blutes $\gamma\delta$ -T-Zellen, wobei sie eine hohe Rezeptor-Diversität aufweisen. Im Gegensatz zum Menschen werden die bovinen $\gamma\delta$ -T-Zellen auch vermehrt in den Trabekeln der Lymphknoten gefunden, außerdem sind sie in den epithelialen Oberflächen der Haut und des Darmtrakts lokalisiert [37]. Bei Kälbern konnten sogar bis zu 60% der zirkulierenden T-Zellen als $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden [38]. Im Schwein, mit über 30% $\gamma\delta$ -TCR-exprimierenden T-Lymphozyten im Blut [39], wurden mehrere unterschiedliche Populationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen

nachgewiesen, z.B. eine die phänotypisch den $\gamma\delta$ -T-Zellen anderer Säuger gleicht, und eine andere, die sich durch die Expression von CD2, CD6 und CD8 unterscheidet [40]. Bei Schafen, in denen 30-60% der T-Zellen als $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden können, wurde der spezielle Oberflächenmarker T19 gefunden, der insbesondere reife $\gamma\delta$ -T-Zellen anfärbt [41]. Auch im Schaf verändert sich der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen altersabhängig: in den ersten Wochen nach der Geburt erhöht sich ihr Anteil schnell auf 60%, dieser fällt dann im Laufe des ersten Lebensjahrs auf 30% ab. Bei adulten Tieren im Alter von 5 bis 8 Jahren sind nur noch 5-10% der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) $\gamma\delta$ -T-Zellen. Ebenso sind $\gamma\delta$ -T-Zellen vor allem im Epithel und der Lamina propria des Intestinus und in der Haut zu finden, und zwar insbesondere in Bereichen, die nicht mit Wolle bedeckt sind [42]. Bei Ziegen ist ebenfalls der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen mit über 20% im peripheren Blut postnatal am höchsten und fällt dann ab [43].

Spezies	Frequenz $\gamma\delta$ -T-Zellen [Beleg]
Mensch	0,5 – 16,0% [6]
Maus	1,0-4,0% [6]
Hund	2,5% [44]
Meerschweinchen	8,6% [45]
Ratte	1,0-5,0% [46]
Rind	20,0-40,0% [37]
Schaf	10-30,0% [42]
Ziege	5,0-20,0% [43]
Schwein	30,0% [39]
Huhn	15,0% [1]
Zebu	11,0-20,0% [47]
Elch	18,0% [48]

Abbildung 1: Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut adulter Individuen

2.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellentwicklung im Säuger

T-Lymphozyten stammen wie auch die B-Lymphozyten von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Die Vorläufer-Zellen wandern aus dem Knochenmark über das Blut in den Thymus ein, wo sie dann reifen [49]. Im Thymus wird den sich entwickelnden Thymozyten ein einzigartiges Mikromilieu geboten; sie erhalten hier durch den Rezeptor Notch1 ein Signal von den Stromazellen, das die spezifischen Gene „anschaltet“ [50]. Die Thymozyten und die

Epithelzellen im Thymus beeinflussen sich gegenseitig [51]; außerdem wird der Thymus auch von Makrophagen, die ebenfalls aus dem Knochenmark stammen, besiedelt. In Mäusen entwickelt sich der Thymus auch drei bis vier Wochen postnatal weiter, wohingegen der Thymus beim Menschen zum Zeitpunkt der Geburt komplett herangebildet ist. Die meiste T-Zell-Produktion erfolgt vor der Pubertät, danach bildet sich der Thymus zurück und die Produktion neuer T-Zellen sinkt, dauert aber lebenslang an. Sowohl im Menschen als auch in der Maus bleibt eine Thymektomie nach der Pubertät ohne merklichen Einfluss auf die T-Zell-Funktion bzw. -Anzahl [52]. Die T-Zell-Vorläufer proliferieren stark im Thymus, 98% von ihnen sterben jedoch direkt im Thymus wieder durch Apoptose [53]. Diese scheinbare Verschwendung von T-Zellen ist ein wichtiger Schritt in der T-Zell-Entwicklung, da alle autoreaktiven Zellen aussortiert werden müssen. Die Unterteilung der T-Zellen in ihre zwei Subtypen mit entweder $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -TCR auf ihrer Oberfläche erfolgt früh während der Reifung im Thymus durch das *gene rearrangement*, dabei sind $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar [54]. Zu Beginn der Entwicklung tragen alle Thymozyten auf ihrer Oberfläche weder CD4 noch CD8 und werden daher als doppelt negativ bezeichnet [55]. Ca. 20% dieser doppelt negativen Zellen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen. Sie wandern aus dem Thymus – im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ -T-Zellen – ohne positive oder negative Selektion in Richtung Peripherie aus. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen verlassen den Thymus in mehreren Wellen, wobei die Zellen aus jeder dieser Wellen jeweils ein anderes Gewebe besiedeln. In der Maus kolonisieren die $\gamma\delta$ -T-Zellen der ersten Welle die Epidermis und bilden dort die DETCs, die zweite Welle besiedelt den Reproduktionstrakt [56]. Trotz der sehr großen theoretisch möglichen Varianz durch das *gene rearrangement* tragen die $\gamma\delta$ -T-Zellen dieser frühen Wellen jeweils einen sehr ähnlichen Rezeptor [57]. In den frühen fetalen Thymozyten ist das Enzym *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) noch nicht nachweisbar, was aber zwingend erforderlich wäre für eine N-Nukleotid-Addition. Die nachfolgenden Wellen an $\gamma\delta$ -T-Zellen migrieren eher in periphere lymphatische Gewebe [52].

2.3.3 Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Säuger

Den $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde bereits eine Vielzahl teilweise widersprüchlicher Effektorfunktionen zugeschrieben, ihre tatsächlichen Funktionen sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Carding und Egan führten 2002 aus, dass man $\gamma\delta$ -T-Zellen überhaupt nicht als einzelne Gruppe von Zellen betrachten könne, da ihre Funktionen

sich entsprechend ihrer Gewebeverteilung, der Struktur ihres Antigenrezeptors, des lokalen Mikromilieus und wie und zu welchem Zeitpunkt der Immunantwort sie aktiviert worden sind, unterscheiden [28]. Da $\gamma\delta$ -T-Zellen in adulten Tieren hauptsächlich in epithelreichen Geweben, wie der Haut, dem Intestinaltrakt oder dem Reproduktionstrakt, gefunden werden, zählt man sie zur „first line of defense“ [6]. Die Entwicklung ihres TCR-Repertoires, die sowohl Thymus-abhängig als auch -unabhängig stattfinden kann [33], die Abwesenheit einer MHC-Restriktion [24] und ihre Fähigkeit sowohl lösliche Proteine als auch Nicht-Protein-Antigene endogenen und exogenen Ursprungs erkennen zu können unterscheidet sie von $\alpha\beta$ -T-Zellen [26]. Da die Antigene zur Erkennung durch den $\gamma\delta$ -TCR weder prozessiert noch an ein MHC gebunden sein müssen [58], können $\gamma\delta$ -T-Zellen ein großes Spektrum an Antigenen erkennen.

Grundsätzlich haben $\gamma\delta$ -T-Zellen zwei Funktionen: die Produktion von Zytokinen und Zytotoxizität. Dabei ähnelt sich das Spektrum produzierter Zytokine zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen fungieren als zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs); jedoch können nur $\gamma\delta$ -T-Zellen diese Zytotoxizität MHC-unabhängig ausüben sowie eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) medieren [5].

In Infektionsversuchen wurde mehrfach belegt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen vor allem in der frühen Phase der Immunantwort eine Rolle spielen, die $\alpha\beta$ -T-Zellen dagegen erst später in Erscheinung treten [59, 60]. Dabei agieren sie in Mäusen nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* als initiale Produzenten von Interferon- γ , bzw. reagieren auf eine Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* mit IL-4-Produktion [61]. In Läsionen von Multiple-Sklerose-Patienten wurde in frühen Stadien der Krankheit ebenfalls mit bis zu 30% der T-Zellen eine erhöhte Frequenz an $\gamma\delta$ -T-Zellen festgestellt, in späteren Stadien dagegen eher $\alpha\beta$ -T-Zellen [62]. In verschiedenen Maus-Modellen von Infektions- und Autoimmunerkrankungen erwiesen sich $\gamma\delta$ -T-Zellen initial als die hauptsächlichen IL-17-Produzenten [36]. IL-17 initiiert die Entzündungsantwort indem es die Reifung von Neutrophilen sowie deren Rekrutierung aus dem Knochenmark induziert [63].

Das Fehlen von $\gamma\delta$ -T-Zellen erlaubt ein schnelles Eintreten von oral zugeführten Mikroben, wie z.B. *Yersinia pseudotuberculosis*, *Toxoplasma gondii* und *Salmonella typhimurium*; der gleiche Effekt tritt bei Abwesenheit von $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht auf [64, 65]. $\gamma\delta$ -IELs im Dünndarm produzieren als Antwort auf penetrierende Bakterien

antimikrobielle Faktoren. Dabei ist die Aktivierung von dem epithelialen zell-internen Signalprotein MyD88 abhängig, was darauf schließen lässt, dass die umgebenden Epithelzellen aktivierend auf die $\gamma\delta$ -T-Zellen einwirken [66].

2.3.4 Struktur des $\gamma\delta$ -TCRs im Säuger

$\gamma\delta$ -T-Zellen, $\alpha\beta$ -T-Zellen und B-Zellen sind die einzigen Zellen, die das somatische Rearrangement von V-, D- und J-Genen zur Generierung der Diversität ihrer Antigen-Rezeptoren nutzen. Sowohl die Identifizierung der γ - als auch die der δ -Kette im Genom erfolgten zufällig [67, 68].

Der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette. Verbunden sind diese beiden Ketten über eine Disulfidbrücke, die nahe der Zellmembran liegt. Jede dieser Ketten hat membranfern variable und membranannäh konstante Regionen. Der intrazelluläre Anteil des TCRs ist sehr kurz, woraus sich die Notwendigkeit eines Cofaktors für die Signalübertragung ins Zellinnere ergibt. Dieser Cofaktor ist der CD3-Komplex. Der CD3-Komplex besteht beim Säuger aus 3 Ketten: der γ -, der δ - und der ϵ -Kette sowie dem $\zeta\zeta$ -Homodimer [69]. Die drei Ketten sind durch schrittweise Genduplikationen aus einem ursprünglichen CD3-Gen entstanden [70, 71]. Die CD3-Ketten formen zwei Dimere, ein CD3 γ -CD3 ϵ - und ein CD3 δ -CD3 ϵ -Heterodimer. Der TCR ist auf der Zelloberfläche nur in Kombination mit dem CD3-Komplex zu finden, da er ihn benötigt, um sich korrekt auf der Oberfläche zu konfigurieren [5].

Die potenzielle Diversität des $\gamma\delta$ -TCRs ist trotz der vergleichsweise geringen V-Gen-Repertoires enorm und größer als die der $\alpha\beta$ -T-Zellen und der B-Zellen zusammen [28]. Dieses vielfältige Rezeptor-Repertoire wird ermöglicht durch die somatische Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente der δ -Kette, bzw. der V- und J-Segmente der γ -Kette und die nachfolgende zufällige Kombination dieser beider Ketten. Die Komplexität der Verbindungsregion zwischen den Gen-Segmenten wird zusätzlich erhöht durch die Addition bzw. Deletion von Nukleotiden in diesem Bereich [72, 73]. Trotz der großen potenziellen Diversität liegen in bestimmten Geweben, beispielsweise der murinen Haut, nur $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einer bestimmten Version des $\gamma\delta$ -TCRs vor [74]. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist bislang weitgehend unklar.

2.4 $\gamma\delta$ -T-ZELLEN IM HUHN

2.4.1 Vorkommen

Das Haushuhn zählt genau wie das Schwein [75], das Rind [37], das Schaf [42] und die Ziege [43] zu den Spezies mit einem hohen Vorkommen von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit bis zu 50% der peripheren Lymphozyten. Sowder et al. entwickelten 1988 den monoklonalen Antikörper TCR1, der ein aviäres CD3-assoziiertes Heterodimer erkennt, welches dem Säuger $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor ähnelt. Dadurch war es erstmals möglich die gewebespezifische Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn zu untersuchen. 10% der Thymozyten, 15% der zirkulierenden Lymphozyten, 25% der Milzzellen und unter 1% der Zellen in Bursa und Knochenmark sind TCR1 positiv [1]. Die ersten Zellen mit $\gamma\delta$ -TCR-Expression auf ihrer Oberfläche erscheinen im Thymus an Tag 12 der Embryoentwicklung (ED12), ab ED15 werden sie auch in der Milz nachgewiesen; dabei ist der Großteil der TCR1 positiven Zellen CD4 und CD8 negativ, nur ein Anteil von 5-15% zeigt sich mit einer Expression von CD8 auf der Oberfläche. In der Milz befinden sich TCR1 positive Zellen vor allem in den Milzsinusoiden und sind häufig CD8 positiv. In der Milz des adulten Huhns formen $\gamma\delta$ -T-Zellen Aggregate im Bereich des Übergangs zwischen Cortex und Medulla, vermehrt um kleine Venen herum [76]. Im Darm findet man TCR1 positive Zellen ab ED16, welche gleichzeitig auch CD8 positiv sind, überwiegend im Epithel, wohingegen in der Lamina propria eher TCR2 positive Zellen mit einer Coexpression von CD4 vorliegen [77]. $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren während ihrer Entwicklung im Thymus kaum CD4 und CD8, sind später im peripheren Gewebe aber häufig CD8 positiv, was unterschiedlich ist zu humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen, die sowohl im Thymus als auch in der Zirkulation doppelt negativ sind [78]. Im Gegensatz zur Maus, in der $\gamma\delta$ -T-Zellen vermehrt in der Epidermis der Haut zu finden sind [79], konnten im Huhn keine TCR1 positiven Zellen in der Haut gefunden werden [77]. Die Frequenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn nimmt mit dem Alter grundsätzlich zu [27].

Auch das Geschlecht des Individuums hat eine Auswirkung auf die Frequenz der $\gamma\delta$ -T-Zellen, so ist bei Hähnen im Alter von 4 bis 6 Monaten eine starke Androgen-induzierte Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut und in der Milz nachweisbar [80].

Der CD8-Corezeptor liegt im Huhn ebenso wie im Säuger entweder als CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer oder als CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer vor. Der Großteil der CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen in Thymus, Milz und Blut von adulten Hühnern exprimiert das Heterodimer, in der Milz von Embryos und jungen Hühnern überwiegt hingegen das

Homodimer. 60% der $\gamma\delta$ -T-Zellen in IELs tragen das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer, 40% das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer [81].

2.4.2 $\gamma\delta$ -T-Zellentwicklung im Huhn

Die Entwicklung der T-Zellen im Huhn erfolgt ähnlich der des Säugers, mit einigen Besonderheiten.

Die Entwicklung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn ist streng Thymus-abhängig [82]. Sie erfolgt in drei Wellen während der embryonalen Entwicklung, jeweils gefolgt von drei kurzen Perioden in denen der Thymus empfänglich ist für die Vorläufer-Stamm-Zellen [83]. Der Thymus als Organ ist mit definiertem Cortex und Medulla ab ED12 erkennbar [84]. Die Kolonisation des Thymus durch T-Zell-Vorläufer beginnt mit der ersten Welle an ED6, die zweite an ED12 und die dritte etwa ab ED18 und dauert an bis kurz nach dem Schlüpfen [85]; jede dieser Wellen erstreckt sich über ein bis zwei Tage und wird von der darauffolgenden Welle durch eine refraktäre Phase getrennt. Dabei korreliert jede Kolonisations-Welle mit einer erhöhten Anzahl an Vorläufer-T-Zellen in der Blutzirkulation. In den refraktären Phasen sind hingegen keine Vorläufer-T-Zellen im Blut nachweisbar. Werden sie jedoch experimentell intravenös injiziert, sind sie in der Lage ohne Verzögerung ihren Weg in den Thymus zu finden [86]. Die Expression der TdT ist in Thymozyten ab ED12 nachweisbar, also erst nach der ersten Welle der Kolonisation, das heißt erst die zweite Generation der T-Lymphozyten ist TdT positiv [87]. Das Enzym TdT ist notwendig für die N-Region-Addition von Nukleotiden nach der somatischen Rekombination aus V, (D,) und J-Gensegmenten des TCRs. Nach jeder Welle entstehen aus den Vorläufer-Zellen drei Tage früher $\gamma\delta$ -T-Zellen als $\alpha\beta$ -T-Zellen. Die unterschiedlichen T-Zelllinien können mit Hilfe monoklonaler Antikörper detektiert werden und zwar mit TCR1 für $\gamma\delta$ -T-Zellen, mit TCR2 für $\alpha\beta$ -T-Zellen mit V β 1-Expression und mit TCR3 für $\alpha\beta$ -T-Zellen mit V β 2-Expression [88, 89]. Die ersten TCR1 positiven Zellen mit dem $\gamma\delta$ -TCR-CD3-Komplex auf der Oberfläche sind an ED12 nachweisbar; ihre Anzahl erhöht sich im Folgenden und erreicht den Höhepunkt an ED15 mit ca. 30% TCR1 positiven Zellen. TCR2 positive Zellen sind ab ED15 nachweisbar mit einem Höhepunkt an ED17 und 18 [84], TCR3 positive dann ab ED18. Auch im Huhn scheinen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen keiner Selektion im Thymus ausgesetzt zu sein. $\alpha\beta$ -T-Zellen werden im Huhn ebenfalls im Thymus positiv und negativ selektiert vergleichbar mit dem Säuger. Unreife TCR2 positive Zellen sind

dabei CD4 und CD8 doppelt positiv, TCR1 positive Zellen sind hingegen doppelt negativ [85].

Die $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ -T-Zellen verlassen den Thymus in Richtung Peripherie in der gleichen Reihenfolge in der sie in ihn eingewandert sind. In der Milz sind $\gamma\delta$ -T-Zellen ab ED15 nachweisbar, TCR2 positive Zellen erst ab ED19 und TCR3 erst zwei Tage nach dem Schlüpfen [90]. Im Darm des Embryos sind $\gamma\delta$ -T-Zellen erstmals ab ED16 oder 17 vorzufinden [82].

2.4.3 Funktionen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn

Da $\gamma\delta$ -T-Zellen in Hühnern in vielen Geweben vermehrt vorkommen, scheinen sie eine wichtige Rolle in der Immunabwehr zu spielen. Verschiedene Studien wiesen nach, dass sich die Frequenz von $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Infektionen im Huhn erhöht.

Da Geflügel eine wichtige Quelle für Salmonella-Infektionen beim Menschen ist, wurden vor allem Studien mit verschiedenen Salmonella-Spezies vorgenommen. Berndt und Methner verglichen im Jahr 2001 die Entwicklung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Frequenz nach Infektion mit einem nicht-attenuierten *Salmonella typhimurium*-Stamm sowie nach Immunisierung mit einem attenuierten Impfstamm mit nicht infizierten Tieren gleichen Alters. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe stieg dabei die Anzahl insbesondere der CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut, im Caecum, in der Bursa und in der Milz deutlich an; dabei waren die Veränderungen bei den infizierten Tieren prägnanter als bei den immunisierten [91]. Eine nachfolgende Studie mit *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis konnte nachweisen, dass im peripheren Blut die Anzahl der CD8 $\alpha\alpha$ hoch positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Immunisierung mit Salmonellen deutlich steigt, was ebenfalls die entscheidende Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen der Hühner in der Abwehr von Salmonella-Infektionen unterstreicht [92].

Die Kokzidiose, ausgelöst durch die intrazellulären protozoischen Parasiten *Eimeria sp.*, ist eine bedeutende Erkrankung in der Geflügelindustrie und daher wurde auch die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen in dieser Infektion früh untersucht. Nach Infektion mit *Eimeria acervulina* erhöhte sich die Anzahl der TCR1 positiven IELs in zwei untersuchten Hühnerrassen deutlich [93]. Dabei stieg auch insbesondere die Anzahl der CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Allerdings bedeutet die Akkumulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht zwangsläufig, dass diese direkt auf die Pathogene antworten, sie könnten auch

regulatorische Einflüsse auf die $\alpha\beta$ -T-Zellen haben oder als bystander-Zellen fungieren, die lediglich durch lokale Zytokine angelockt wurden [94]. Dennoch zeigen CD8 positive $\gamma\delta$ -T-Zellen den Phänotyp von aktivierten Zellen, z.B. sind sie größer und exprimieren MHC Klasse II auf ihrer Oberfläche [95].

In Untersuchungen der Graft-versus-Host-Reaktion in Hühnern konnte gezeigt werden, dass Wirts- $\gamma\delta$ -T-Zellen in Regionen von Läsionen, die durch Spender- $\alpha\beta$ -T-Zellen verursacht wurden, rekrutiert und aktiviert wurden, sodass sie dort proliferierten [96].

2.4.4 Struktur des $\gamma\delta$ -TCRs im Huhn

Der Aufbau des $\gamma\delta$ -TCRs beim Haushuhn entspricht im Wesentlichen dem des Säugers. Der TCR des Huhns ist ein heterodimerer Oberflächenrezeptor zur Erkennung von Antigenen. Jede TCR-Kette besteht dabei aus zwei Domänen der Immunglobulin-Superfamilie mit jeweils einem variablen und einem konstanten Anteil. Die beiden Ketten sind durch eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden.

Der membranferne variable Anteil besteht im Fall der δ -Kette aus einem V-, einem D- und einem J-Element, bei der γ -Kette aus einem V- und einem J-Element. Verglichen mit dem $\alpha\beta$ -TCR entspricht die δ - der β -Kette und die γ - der α -Kette, bzw. erstgenannte ähneln der schweren Kette der Immunglobuline und letztere der leichten Kette. Durch den Vorgang der somatischen Rekombination entsteht im Bereich der hypervariablen Region 3 (CDR3), also der Verbindung aus VDJ bzw. VJ, eine große Sequenzdiversität. Diese wird zusätzlich erweitert durch das zufällige Anfügen und Entfernen von Nukleotiden an den Verbindungsstellen zwischen V (, D) und J. Außerdem erfolgt die Kombination verschiedener γ - und δ -Ketten zufällig, wodurch die Vielfalt des Rezeptor-Repertoires weiter erhöht wird. Im Gegensatz zu den B-Zellen erfolgt bei den T-Zellen aber keine zusätzliche Erweiterung der Rezeptorvarianz durch somatische Hypermutation in germinalen Zentren sowie kein *gene conversion* [27].

Der konstante Teil des TCRs ist durch den transmembranösen Anteil in der Zellmembran verankert und hat einen sehr kurzen zytoplasmatischen Schwanz, wodurch kein direktes Signal ins Zellinnere weitergegeben werden kann. Daher benötigt jeder TCR Hilfe zur Signalübertragung durch den CD3-Komplex. Im Gegensatz zum Säuger, der drei Gene für den CD3-Komplex besitzt [97], haben Haushühner nur zwei Gene: ein Homolog zu CD3 ϵ und ein Homolog zu CD3 γ/δ . Beide Gene sind auf dem

Chromosom 24 zu finden [98, 99]. Ebenso wie der Säuger besitzt auch das Huhn das $\zeta\zeta$ -Homodimer, welches auf dem Chromosom 1 kodiert wird. Ein funktioneller $\gamma\delta$ -TCR besteht immer aus einer γ - und einer δ -Kette, CD3 ϵ und CD3 γ/δ und einem $\zeta\zeta$ -Homodimer (siehe Abbildung 2).

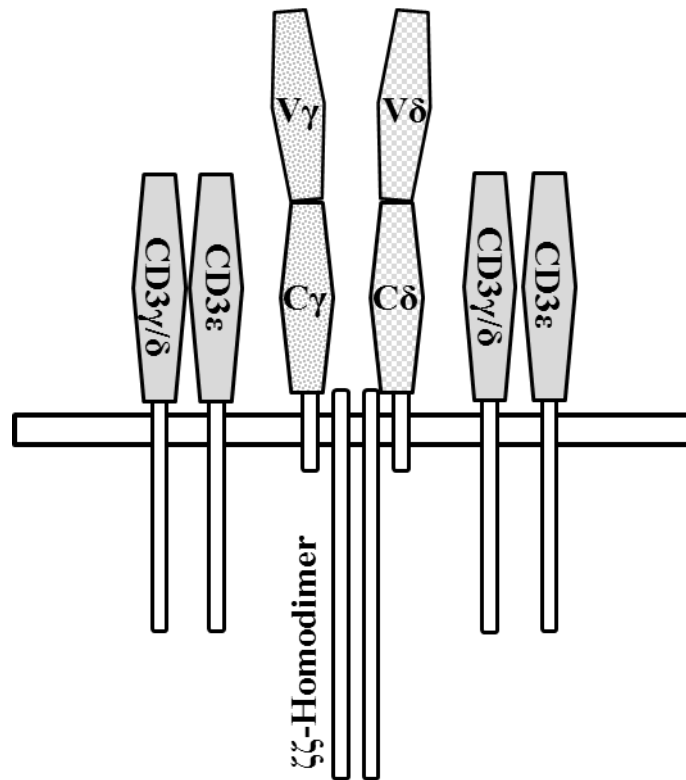


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des $\gamma\delta$ -TCR-CD3-Komplexes

Die Gene, die die δ -Kette kodieren, liegen beim Huhn auf Chromosom 27 zwischen den Sequenzen für $V\alpha$ und $J\alpha$ der $\alpha\beta$ -TCRs (siehe Abbildung 3). Der Locus für die δ -Kette besteht aus einer Familie von $V\delta$ -Genen mit 36 Mitgliedern, zwei Versionen von $D\delta$, zwei von $J\delta$ und einem Gen für $C\delta$ [100, 101]. Beim Huhn wurde außerdem auf dem Chromosom 10 ein zweiter TCR δ -Locus entdeckt, der ebenfalls ein V, ein D, ein J und ein C enthält, dessen Bedeutung aber bislang unklar ist [102].

Die Gene der γ -Kette liegen beim Huhn auf dem Chromosom 2. Sie bestehen aus drei $V\gamma$ -Familien mit jeweils acht bis zehn Mitgliedern, drei Versionen von $J\gamma$ und einem Gen für $C\gamma$ [103].

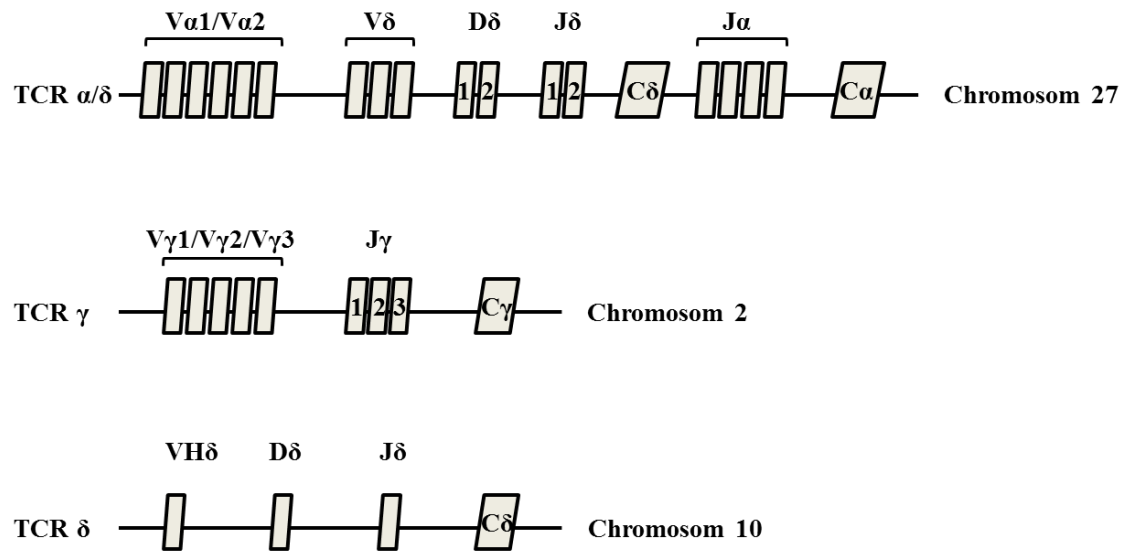


Abbildung 3: Schema der TCR-Genloci des Haushuhns

2.5 ZYTOTOXIZITÄT

Im Immunsystem besitzen verschiedene Zellen zytotoxische Fähigkeiten: Natürliche Killerzellen (NKs) und zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) [104]. Diese haben damit die Möglichkeit körpereigene Zellen, die für den Organismus eine Gefahr darstellen könnten, abzutöten. Ihre Ziele können viral, bakteriell oder parasitär infizierte oder neoplastisch veränderte Zellen sein. Entscheidend ist hierbei die verlässliche Unterscheidung zwischen fremd/verändert und körpereigen/gesund, um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Nach Erkennung der Zielzelle schüttet die zytotoxische Zelle entweder mittels Exozytose aus ihren präformierten, zytoplasmatischen Granula Perforin und Granzym aus, was zu Membranläsionen auf der Zielzelle und letztendlich zu deren Zelltod führt [105], oder sie vermittelt über die Interaktion zwischen Fas-Rezeptor (CD95) und Fas-Ligand die Apoptose der Zelle [106].

2.5.1 Zytotoxizität bei Säuger-NK-Zellen

Die natürlichen Killerzellen von Säugern erkennen gesunde körpereigene Zellen daran, dass sie Selbst-MHC Klasse I-Moleküle sowie inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren tragen. Ein Fehlen dieses Selbst-MHC-Klasse I-Moleküls auf einer Zielzelle – das sogenannte „missing self“ [107] – induziert die Lyse der Targetzelle mit Hilfe von aktivierenden Rezeptoren [108]. NK-Zell-ähnliche Aktivität wurde in vielen Wirbeltieren nachgewiesen und wird als ein Teil der frühen Immunantwort verstanden, die eine Rolle spielt, noch bevor T- und B-Lymphozyten überhaupt auftauchen [109]. Natürliche Killerzellen sind als Zellen des angeborenen Immunsystems in die Immunabwehr von Tumoren und die frühe Kontrolle von intrazellulären Pathogenen involviert; ihre hauptsächlichen Funktionen dabei sind die Zytotoxizität sowie die Produktion von Zytokinen [110]. Sie üben ihre sogenannte „natürliche“ Zytotoxizität nicht-adaptiv, MHC-unabhängig und zellmediert aus [111].

2.5.2 Zytotoxizität bei Säuger- $\gamma\delta$ -T-Zellen

Borst et al. untersuchten im Jahr 1987 Klone von peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs), die durch CD3 auf ihrer Oberfläche als T-Lymphozyten zu bestimmen waren, die aber sowohl CD4 als auch CD8 negativ waren und die weder eine α - noch eine β -Kette des

TCRs trugen. Diese Population von T-Zellen zeigte eine MHC-unabhängige Zytotoxizität gegenüber Zielzellen. Auf ihrer Oberfläche konnte die γ -Kette in Assoziation mit CD3 detektiert werden, woraus geschlossen werden kann, dass es sich hierbei um zytotoxische $\gamma\delta$ -T-Zellen handelt. Diese Zellen ähneln mit ihrem CD3 positiven, aber CD4 negativen und CD8 negativen Phänotyp eher den NK-Zellen als den bis dato bekannten zytotoxischen $\alpha\beta$ -T-Zellen, die CD3 und CD8 positiv waren. Auch die Befähigung zur MHC-unabhängigen Zytolyse und zur Mediation von ADCC gleicht den CD3 negativen NK-Zellen [5]. Kurz darauf konnten auch für murine IELs zytolytische Fähigkeiten nachgewiesen werden, und zwar insbesondere für $\gamma\delta$ -T-Zellen mit CD8-Expression [112]. Phillips et al. zeigten, dass primäre Thymozyten mit $\gamma\delta$ -TCR-Expression keine Zytolyse medieren konnten, nach Kultivierung mit IL-2 hingegen war eine MHC-unabhängige Zytotoxizität nachweisbar [4].

Seitdem wurden vielseitige zytotoxische Fähigkeiten von $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen. Humane V γ 9V δ 2-T-Zellen können infizierte, aktivierte und transformierte Zellen über verschiedene Wege abtöten, die Zelltod-induzierende Rezeptoren wie CD95 (Fas) und TNF beinhalten, und über die Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen wie Perforin und Granzym [113, 114]. Außerdem tragen sie direkt zur Pathogen-Beseitigung bei indem sie bakteriostatische bzw. bakteriolytische Moleküle wie Granulysine oder Defensine produzieren [114, 115]. Indirekt können sie antibakterielle Funktionen von anderen Immunzellen bzw. Epithelzellen induzieren, z.B. indem sie mittels IL-17A neutrophile Granulozyten anlocken [116].

2.5.3 Zytotoxizität bei Hühner-NK-Zellen

Die spontane Zytotoxizität ohne vorausgegangene Sensibilisierung ist ein typisches Charakteristikum von natürlichen Killerzellen, die einen wichtigen Bestandteil der zellmedierten Immunität darstellen. NK-Zellen beim Huhn wurden in adulter Milz [117] und in der Milz von Embryonen nachgewiesen [118]. Da diese Zellen CD8 positiv aber gleichzeitig TCR negativ waren, wurden sie als TCR0-Zellen bezeichnet. Sie ähneln den Säuger-NK-Zellen in ihrer Morphologie, einigen Oberflächenmarkern und der Tatsache, dass sie Zielzellen spontan lysieren können [118]. Im Huhn sind NK-Zellen vor allem im intestinalen Epithel zu finden, allerdings kaum in Milz, Lunge und Blut [2, 109], was gegensätzlich zum Säuger ist. Chai und Lillehoj wiesen bereits 1988 mittels Chromium-release-Assay nach, dass IELs aus dem Intestinum von zwei

verschiedenen Hühnerrassen NK-Zell-Aktivität gegenüber Hühner-Tumorzellen medieren können [119]. Mit Hilfe des Antikörpers 28-4 wurden CD3 negative IELs als NK-Zellen identifiziert und ihre Zytotoxizität gegenüber RP9-Targetzellen wurde bewiesen [109]. Auch in embryonalen und adulten Splenozyten konnten mittels NK-Zell-spezifischer Antikörper zytotoxische NK-Zell-Aktivität gegenüber der Zielzelllinie RP9 gefunden werden, allerdings nicht gegenüber der Zelllinie 2D8 [120].

2.5.4 Zytotoxizität bei Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen

In Milzzell-Kulturen, die mit Concanavalin A und IL-2 stimuliert wurden, wachsen bevorzugt $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diesen Zellen wiesen Choi und Lillehoj zytotoxische Fähigkeiten gegenüber LSCC-RP9-Zellen nach, welche zuvor als typische Zielzellen für aviäre NK-Zellen dienten [121]. Weitere Untersuchungen der Zytotoxizität von Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden bisher nicht publiziert.

3 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es die zytotoxischen Fähigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellen des Haushuhns zu charakterisieren.

Aufgrund der im Vergleich zum Säuger niedrigen Frequenz an NK-Zellen im Huhn, trotz gleichzeitig eindeutig nachweisbarer zytolytischer Aktivität, lässt sich vermuten, dass die Ausübung dieser Zytotoxizität von anderen Zellen übernommen wird. Mit den Untersuchungen dieser Arbeit sollte die Hypothese, dass die zytotoxische Aktivität im Huhn hauptsächlich von $\gamma\delta$ -T-Zellen ausgeführt wird, überprüft werden. Dazu sollte auch das zytolytische Potenzial von $\gamma\delta$ -T-Zellen aus verschiedenen Geweben verglichen werden. Eine genauere Charakterisierung der beteiligten Subpopulationen sollte ebenfalls erfolgen. Außerdem sollten verschiedene Einflüsse auf die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn beleuchtet werden, wie die Wahl der Zielzelllinie sowie die Auswirkungen einer Stimulation mit Zytokinen.

4 PUBLIKATION

Developmental and Comparative Immunology 73 (2017) 175–183



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci



$\gamma\delta$ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken



Lisa Fenzl, Thomas W. Göbel*, Marie-Luise Neulen

Institute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2017

Received in revised form

31 March 2017

Accepted 31 March 2017

Available online 1 April 2017

Keywords:

Chicken

$\gamma\delta$ T cell

Cytotoxicity

Interleukin-2

Interleukin-12

ABSTRACT

Natural killer cells in the chicken are mainly confined to the intestine, while only small frequencies are detectable in spleen, lung and blood. Here, we compared the spontaneous cytotoxicity of lymphocytes isolated from blood, spleen and intestine using a flow cytometric based cytotoxicity assay. There was no spontaneous cytotoxicity detected in chicken blood preparations. In contrast, freshly prepared splenocytes exhibited a spontaneous cytotoxicity of up to 50% and intestinal epithelial lymphocytes of up to 85%. This cytotoxicity was observed against the RP9 but not against the chicken CU24 target cell line. The observed cytotoxicity was MHC unrestricted since B²B² derived effector cells killed RP9 target cells (B²B¹⁵) equally well compared to MHC mismatched 2D8 targets (B¹⁹B¹⁹). The cytotoxicity of splenocytes was enhanced by preincubation with IL-2 or strongly increased with IL-2 plus IL-12. By cell sorting, we identified the CD8⁺ $\gamma\delta$ T cell subset as the major effectors, whereas both CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells had only low cytolytic potential. Within intestinal lymphocyte CD45⁺ cells displayed cytotoxicity as well as sorted $\gamma\delta$ T cells and NK cell. In conclusion, the chicken $\gamma\delta$ T cells represent a major cytotoxic lymphocyte subset that can lyse target cells in a MHC unrestricted manner.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spontaneous cytotoxicity without prior sensitization by antigen is a hallmark of natural killer cells. Over the last decade, we and others have characterized chicken NK cells and their receptors (Jansen et al., 2010; Straub et al., 2013). Originally, chicken NK cells were identified in adult (Sharma, 1981) and embryonic spleen, designated TCRO cells (Gobel et al., 1994; Rogers et al., 2008). This name was chosen to denote the absence of TCR expression while the cells were surface CD8 positive. The cells were detected early during ontogeny from embryonic day 14 on. They were subsequently diluted by the consecutive migration of T cells from the thymus to the periphery. These embryonic chicken NK cells had many features of mammalian NK cells including the morphology, several surface markers such as CD8 and a Fc receptor and most importantly they lysed target cells spontaneously (Gobel et al., 1994).

In a next step of NK cell analysis, we searched for chicken NK cells in adult chickens. For this purpose, we have identified several

chicken homologues of NK cell receptors, produced specific antibodies and detected cells bearing these receptors in various tissues (Straub et al., 2013). In addition, we used the combination of CD3 and CD8 markers to identify NK cells as CD8 positive lymphocytes lacking surface CD3 expression. In the blood, we defined a low frequent population of NK cell like cells that lacked CD8 but instead expressed CD4. These cells secreted interferon- γ , but lacked detectable cytotoxicity (Neulen et al., 2015). From all of these studies a picture emerged showing that chicken NK cells are mainly located in the intestinal epithelium, whereas other tissues such as spleen, blood and lung (Neulen and Gobel, 2012) contain very low frequencies of NK cells well beyond 1% of the total lymphocyte population (Neulen et al., 2015). This finding was unexpected since mammals harbor large numbers of NK cells in lymphoid tissues such as blood, spleen or lung.

The intestinal NK cell population has been further characterized with the help of a specific mAb 28–4 that labels the CD3 negative CD8 positive NK cells, but not the CD3 positive T cells (Gobel et al., 2001). We could recently clarify the molecular identity of the antigen recognized by the 28–4 mAb as chicken CD25 (unpublished result). The 28–4 positive NK cells and the CD3 positive T cells represent the two major intestinal lymphocyte populations (Gobel et al., 2001). As in the embryonic spleen, the 28–4 positive NK cells

* Corresponding author.

E-mail address: goebel@lmu.de (T.W. Göbel).

are the first lymphocytes present in the intestine even before hatch, whereas the epithelium is seeded with T cells only after hatch.

To reveal cytotoxic activity of NK cells the ^{51}Cr release assay was used for a long time, as first described by Brunner in 1968 (Brunner et al., 1968). Although this method provides reliable results it also contains disadvantages like environmental and health hazards as well as the expensive and inconvenient handling of radioisotopes. Different methods were developed to avoid radioactive isotopes including flow based direct methods analog to ^{51}Cr assay or several indirect methods detecting degranulation like the CD107 assay (Betts et al., 2003; Hatam et al., 1994; Kim et al., 2007; Piriou et al., 2000; Vitale et al., 1989; Wang et al., 2003). The single susceptible target cell line that has been used for cytotoxicity assays with chicken NK cells is the LSCC-RP9 line derived from a lymphoid tumor induced by Rous-associated virus 2 (Sharma and Okazaki, 1981).

During initial experiments we noticed a high spontaneous cytotoxic activity within IEL cells and splenocytes. Hypothesizing that the cytotoxic activity was exerted by $\gamma\delta$ T cells gave us the incentive to study the cytotoxic potential of these cells in more detail. For this purpose we refined the flow based assay system to detect cytotoxic activity in chicken cells.

Irrespective of the fact that little is known about the detailed role and effector mechanisms of $\gamma\delta$ T cells, *in vitro* studies have demonstrated that they exert cytotoxic function (Phillips et al., 1987). In addition, long term ConA stimulated splenocytes, expressing CD3, CD8 and TCR1, showed spontaneous cytotoxic activity (Choi and Lillehoj, 2000).

Chickens harbor a large population of $\gamma\delta$ T cells in various peripheral tissues such as blood, spleen and intestine. Their frequency can reach up to 50% of the circulating T cell population depending on strain, age and sex of the animals. Thus chickens belong to the group of animals with high $\gamma\delta$ T cell frequencies (Sowder et al., 1988) that also include pigs (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008), cattle, sheep (Mackay and Hein, 1989; McClure et al., 1989) and goats (Caro et al., 1998) as opposed to human, rat and mouse with lower $\gamma\delta$ T cell numbers (Hayday, 2000; Shekhar et al., 2012). The potential $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire is at least as high as that of the $\alpha\beta$ TCR (Davis and Bjorkman, 1988). In man and mouse peripheral $\gamma\delta$ T cells show limited TCR diversity. Moreover, certain $\gamma\delta$ T cell subsets home exclusively to tissues such as skin. In contrast, chickens possess higher numbers of circulating $\gamma\delta$ T cells and their potential TCR diversity is high given the numbers of V(D) and J segments. However, it remains unclear whether this combinatorial $\gamma\delta$ TCR diversity is also present in the periphery and if there are canonical V γ V δ combinations at certain epithelial locations (Kubota et al., 1999; McCormack et al., 1991; Su et al., 1999).

In contrast to $\alpha\beta$ T cells, mammalian $\gamma\delta$ T cells recognize their ligands in an MHC unrestricted manner. They respond to non-peptide antigens like glycoproteins and other small molecule polypeptides. A special subset of human $\gamma\delta$ T cells, V γ 9V δ 2 T cells, responds to ligands such as pyrophosphate molecules produced by microorganisms. Whether this is likewise applicable for chicken $\gamma\delta$ T cells has yet to be elucidated.

Mammalian $\gamma\delta$ T cells can be primed through engagement of TCR independent receptors when exposed to pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (Holderness et al., 2013). TLR agonists, such as TLR3 and TLR4 have been characterized in chicken $\gamma\delta$ T cells (Pieper et al., 2008) as well as scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily members workshop cluster-1 (WC1) (Sarrias et al., 2004) like genes (Herzig et al., 2010) and a CD6 homologue for the chicken (Gobel et al., 1996). Currently it is not known whether these receptors can trigger a TCR independent activation in chicken $\gamma\delta$ T cells.

A common feature of $\gamma\delta$ T cell ligands described so far is their

upregulation in response to cellular infection or dysregulation leading to a broad spectrum of effector functions (Bonneville et al., 2010). The contribution of $\gamma\delta$ T cells in the defense of pathogens is well investigated in many different infectious scenarios in mouse models and in human pathologies (Abate et al., 2015; Khairallah et al., 2015; Maher et al., 2015; Pauza et al., 2014; Sutton et al., 2012). There is evidence for the expansion of particular CD8 $\alpha\alpha$ positive $\gamma\delta$ T cell subsets in spleen, caecum and blood of salmonella infected chickens (Berndt et al., 2006). Similarly, during infection of chickens with *Eimeria acervulina*, early increase of $\gamma\delta$ T cells was observed in the intestine (Lillehoj, 1994).

Although the frequency of chicken $\gamma\delta$ T cells is high, their function and role for the immune response is currently unknown. In this study we wanted to clarify if the high $\gamma\delta$ T cell numbers can functionally substitute the low NK cell frequency. We present evidence for the role of $\gamma\delta$ T cells as potent cytotoxic cells in the chicken system. $\gamma\delta$ T cells exerted spontaneous cytotoxicity and this effect could be enhanced by IL-2 supplement to the cell culture. When IL-2 was combined with IL-12 the cytotoxic effect was substantially higher as compared with IL-2 alone. CD8 positive $\gamma\delta$ T cells showed the highest cytotoxic activity, while CD8 negative $\gamma\delta$ T cells as well as CD8 positive $\alpha\beta$ T cells showed less cytotoxic reactivity. CD8 negative $\alpha\beta$ T cells lack activity against the RP9 targets.

2. Material and methods

2.1. Animals

Chicken line M11 (RSV RES Line Mr; MHC: B 2 B 2) was kindly provided by S. Weigend (Institute for Animal Breeding, Mariensee, Germany). Fertilized Eggs were incubated and hatched at the Institute for Animal Physiology, University of Munich. The animals were housed under conventional conditions and experiments were performed at the age of 6–16 weeks. The animal work in the study was performed in accordance with institutional, state and federal guidelines on animal welfare. The specific experiments were approved by the committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Government of Upper Bavaria, Germany (permit number 55.2-1-54-2532.0-60-2015) and all efforts were made to minimize animal suffering during experiments.

2.2. Antibodies for flow cytometry

Single-cell suspensions were prepared and stained with antibodies with the following specificities: CD45 (unlabeled, clone 16–6, mouse IgG2a) (Viertlboeck and Gobel, 2007) available from AbD Serotec (Duesseldorf, Germany), CD25 (unlabeled, clone 28–4, mouse IgG3) (Gobel et al., 2001), $\gamma\delta$ TCR (unlabeled or FITC conjugate, clone TCR1, mouse IgG1) (Sowder et al., 1988) and CD8 (PE conjugate, clone CT8, mouse IgG1) were obtained from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, USA). For magnetic bead separation, the IEL cells were labeled with the primary anti-CD45, anti-TCR1 or anti-CD25 mAb. Subsequently, the cells were magnetically labeled with isotype-specific microbeads (anti-mouse IgG2a, anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Labeled cells were analyzed by flow cytometry (FACS Canto II, Beckton Dickinson) using the BD FACS DIVA 6.1.3 software. In case of double immunofluorescence analysis for cell sorting, the cells were stained with a mixture of anti-TCR1-FITC and anti-CD8-PE conjugate. Cell sorting was carried out on a FACSaria III instrument (BD, Heidelberg, Germany).

2.3. Cytokines

For the expression of chicken recombinant IL-2 cytokines the

M15pREP4 *E. coli* strain was transformed with a chicken IL-2 His tag construct. His-tagged recombinant IL-2 cytokines were then affinity purified by use of nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography. The biological activity was evaluated in a bioassay and best results were obtained with a 1:200 dilution.

Chicken IL-12p35 and IL-12p40 proteins were synthesized as described before (Degen et al., 2004) and biological activity of recombinant chicken IL-12 cytokines was found best at a 1:1000 dilution.

2.4. Effector cells

Heparinized whole blood was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density centrifugation (Gobel et al., 2001). Chicken splenocytes were obtained by passing the organ through a stainless steel mesh and subsequent density centrifugation of the single cell suspension on Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Germany). IELs from the duodenal loop were prepared as described before (Gobel, 2000). CD45⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺ and CD25⁺ cells were isolated from the intraepithelial lymphocyte population using magnetic bead selection according to the manufacturer's specifications (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were tested for purity and were 95–98% pure. For the isolation of splenic $\gamma\delta$ T cell subsets, the cells were stained with the TCR1⁺ and CD8 mab and selected into TCR1⁺/CD8 α ⁺, TCR1⁺/CD8 α ⁻, TCR1⁻/CD8 α ⁺ and TCR1⁻/CD8 α ⁻. Afterwards, cells were either used directly or they were cultured before performing the cytotoxicity assay. At the start of the cultures, chicken IL-2, chicken IL-12 or a combination of both cytokines were added. Cultures were refreshed every second day by demi-depletion (50% volume change) supplemented with the previously mentioned cytokines. The cytotoxic assays were performed in each condition on culture time of 48–96 h. The cells were then resuspended in culture medium (RPMI 1640/10%FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at a density of 5×10^6 cells per 100 μ L. 1×10^6 cells were used for the 100% effector condition.

2.5. Target cells

The target cell-lines that were used to study the cytotoxic potential of distinct effector cells were the LSCC-RP9 (LS = Leukosis/sarcoma virus group, CC = chicken cell-line) cell-line, which has a MHC genotype background of B²B¹⁵ and the 2D8 cell-line with a MHC background of B¹⁹B¹⁹ (Puehler et al., 2003). The cells were cultured in standard medium (RPMI 1640/10% FBS) at 40 °C in the atmosphere of 5% CO₂ in air. The MDCC-CU24 (MD = Marek's disease virus group) cell line (MHC genotype background of B¹⁹B²) was used as a control for the cytotoxicity-assay. The MDCC-CU24 cells (Schat et al., 1991) were maintained in RPMI 1640 supplemented with FBS (8%), chicken serum (2%) and P/S (1%) at 40 °C in the atmosphere of 5% CO₂. All target cells were harvested at the log phase of growth.

2.6. Cytotoxicity assay

Cytotoxic function was measured by flow cytometry-based cytotoxicity assay. The target cells were washed twice with PBS and labeled with Cell Proliferation Dye eFluor670 (ebioscience, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) in a concentration of 5 μ M for 10 min at 40 °C and 5% CO₂ in air. The labeled cells were washed three times with culture medium, resuspended in culture medium, and counted. The effector cells were co-incubated in a volume of 150 μ L in culture medium in triplicates into the wells of a 96-well round bottom microtiter plate at the E:T ratios of 100:1, 50:1, 25:1, 12:1, 6:1, 3:1 and 1:1 for 3 h at 40 °C in the atmosphere of

5% CO₂ in air. As controls, targets or spleen cells were incubated alone in culture medium to measure spontaneous cell death. Dead cells were excluded by forward light-scatter gating and propidium iodide (1 μ g/mL, PI, Sigma, Deisenhofen) staining. Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) were added in order to obtain absolute cell counts. The fluorospheres were gently vortexed and an equal volume of 10 μ L was added to each sample. Stained samples were analyzed by multicolor flow cytometry immediately after the end of the incubation period. The data was analyzed using the BD FACS Diva 6.1.3 software. The stop and save functions were used to acquire 2000 bead-counts (Flow-Count Fluorospheres) for each sample. Cells were acquired at a low flow rate. For analysis, the beads were discriminated by their distinctive scatter and fluorescence signature (Fig. 1A). Previously gated splenocytes and target cells were displayed and eFluor670-stained target cells were separated from the unstained splenocytes (Fig. 1B). eFluor670⁺ cells were gated and shown in a new datasheet to evaluate the proportion between live and dead target cells. However, some targets may have been dead prior to co-incubation with effector cells or died spontaneously without effector cells present. The percentage of spontaneously dead targets was measured using a sample containing targets only and the obtained scores were subtracted from the calculation as mentioned in the following equation. To determine the cytotoxic activity of effector cells within different effector to target ratios the percentage of specific cell death of each sample was calculated: the percentage of dead targets, minus the percentage of spontaneous dead targets, divided through 100 minus the percentage of spontaneous dead target cells multiplied by 100. Since triplicates of each effector: target ratios were measured the mean value was calculated.

3. Results

3.1. The flow based cytotoxicity assay is suitable to detect spontaneous cytotoxicity against the RP9 cell line

In the chicken, there has been a single target cell line, designated LSCC-RP9 (RP9) (Sharma and Okazaki, 1981). This cell line has been frequently used in chromium release assays and also recently in flow cytometric cytotoxicity assays (Jansen et al., 2010). In Fig. 1 the setup of the assay is demonstrated. The target cells were labeled with the fluorescent dye eFluor670 that had no effect on the viability of the cells during the assay. Labeled target cells and effector cells were cocultured and before cytometric measurement, propidium iodide for detection of dead cells, as well as Flow-Count Fluorospheres in order to standardize the assay, were added. After gating of eFluor670⁺ RP9 cells (Fig. 1B) the fraction of propidium iodide positive dead cells was detected (Fig. 1C) and the percentage of specific cell death could be calculated.

3.2. Spontaneous cytotoxicity is detectable in spleen and IEL and absent in blood

We surveyed freshly prepared splenocytes and PBMC for their spontaneous cytolytic activity against the RP9 cells employing the assay described above. There was no cytotoxic activity detectable for a wide range of E:T ratios when PBMCs were employed. In contrast, spontaneous cytotoxicity was readily detected for freshly isolated splenocytes ranging from approximately 50% specific cell death at a 100:1 E:T ratio to about 10% at a 3:1 ratio and in freshly isolated IEL cells ranging from approximately 80% specific cell death at a 100:1 E:T ratio to about 15% at a 3:1 E:T ratio (Fig. 2A). Next we investigated whether this cytotoxicity was specific. For this purpose we used the chicken target cell line CU24. CU24 represents

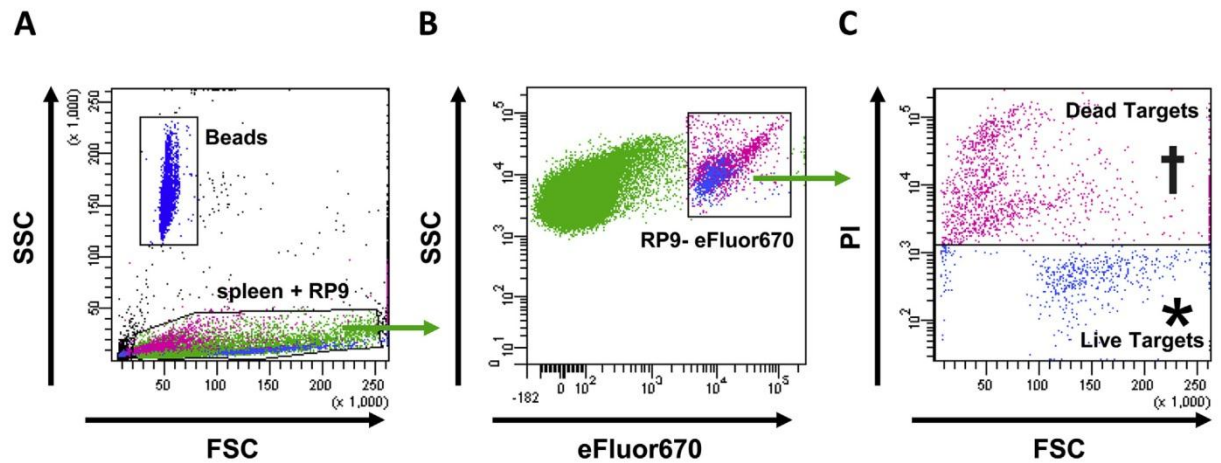


Fig. 1. Flow cytometric cytotoxicity assay. **A:** Effector and target cells are separated from beads. **B:** Targets cells are gated according to their staining with eFluor670. **C:** Dead target cells are identified by high PI-uptake.

a Marek's disease virus transformed cell line. In general Marek's disease virus transformed cell lines are resistant to spontaneous lysis (Sharma and Okazaki, 1981). Whereas RP9 cells were killed in a dose dependent fashion, there was no cytotoxicity observed against CU24 cells (Fig. 2B). As the effector cells were isolated from a M11 chicken with the genetic background of B²B² and the target cell line RP9 were of B²B¹⁵ origin, we next investigated whether the cytotoxic activity might be MHC restricted. For this purpose we used the chicken 2D8 cell line with the genetic background of B¹⁹B¹⁹ as target cells. This cell line has been generated using the splenic necrosis virus T strain and has not been used as target cell line before. When 2D8 cells were tested as target cells, they were lysed equally well as compared to RP9 (Fig. 2C). Likewise, incubation of RP9 targets with the anti-chicken MHC I antibody (clone F21-2) did not change the cytotoxic effect (data not shown). Taken together, splenocytes but not PBMCs show spontaneous lytic activity against RP9 cells and MHC mismatched 2D8 cells, but not against CU24 cells.

3.3. The combination of IL-2 and IL-12 increases spontaneous cytotoxic potential

Next we investigated if stimulation with cytokines would increase the cytotoxic potential of the splenocytes. For this purpose cells were incubated with IL-2, IL-12, and the combination of IL-2 and IL-12 for 48 h prior to the assay. These stimulated cells were compared to cells cultured in the absence of cytokines. The IL-2 stimulation caused a substantial increase of the cytotoxicity (Fig. 3A). At a 50:1 E:T ratio, unstimulated and IL-12 treated cells caused a 20% specific cell death, whereas the IL-2 stimulated cells induced more than 40%. The combination of IL-2 and IL-12 caused the highest cytotoxic activity with up to 80% specific cell death. To examine if distinct periods of cytokine stimulation affect the cytotoxic potential, we stimulated splenocytes with the combination of IL-2 and IL-12 for 48, 72 and 96 h prior performing the cytotoxicity-assay (Fig. 3B). In conclusion, this lytic activity was enhanced by preincubation with IL-2, especially when IL-2 was combined with IL-12. There were almost no differences in the cytotoxicity level measurable, when different terms of preincubation with the combination of IL-2 and IL-12 were applied.

3.4. Splenic CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells represent a major cytolytic lymphocyte subset

We next evaluated whether distinct $\gamma\delta$ T cell subsets present in the spleen, show differences in their cytolytic capacity. To this end splenocytes were sorted according to their TCR1 and CD8 expression into four subpopulations and subsequently used for the cytotoxicity assay. When sorted cells were directly used in the cytotoxicity assay, no cytolytic capacity was observed (Fig. 4B). Therefore we again separated splenocytes into four subsets based on the TCR1 and CD8 expression and stimulated the cells with IL-2 and IL-12 for 48 h resulting in different levels of cytotoxic activities within the sorted populations. The highest specific cell death was executed by the double positive TCR1⁺ CD8⁺ population (Fig. 4C). Intermediate activity was detected by CD8⁺ TCR1⁻ cells and with lower values also by the TCR1⁺ CD8⁻ subset, whereas almost no cytotoxicity was observed by the double negative cells. These results demonstrate that CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells are the major cytolytic T cell subset in the spleen.

3.5. Intestinal NK cells and $\gamma\delta$ T cells show comparable spontaneous cytotoxicity

The intestinal epithelium is a major site for chicken NK cells. We therefore tested the spontaneous activity of IEL against RP9 cells. Since the IEL preparations are always contaminated with epithelial cells, we employed CD45 magnetic cell sorting before the assay. CD45⁺ cells were highly cytolytic against the target cells with values above 80% at a 100:1 E:T ratio (Fig. 5A).

We subsequently separated TCR1⁺ $\gamma\delta$ T cells from the IEL preparations by magnetic cell sorting and obtained specific cell death values which were comparable to the CD45 sorted cells (Fig. 5B). We also compared the cytolytic capacity of 28–4⁺ NK cells with TCR1⁺ $\gamma\delta$ T cells magnetically sorted from the IEL preparation. Both subsets exhibited similar cytotoxicity with specific cell death of 50–60% at a 35:1 E:T ratio (Fig. 5C). Taken together, both major intestinal lymphocyte populations show high spontaneous cytotoxicity against RP9 cells.

4. Discussion

Since the discovery of cytotoxic function in chicken spleen,

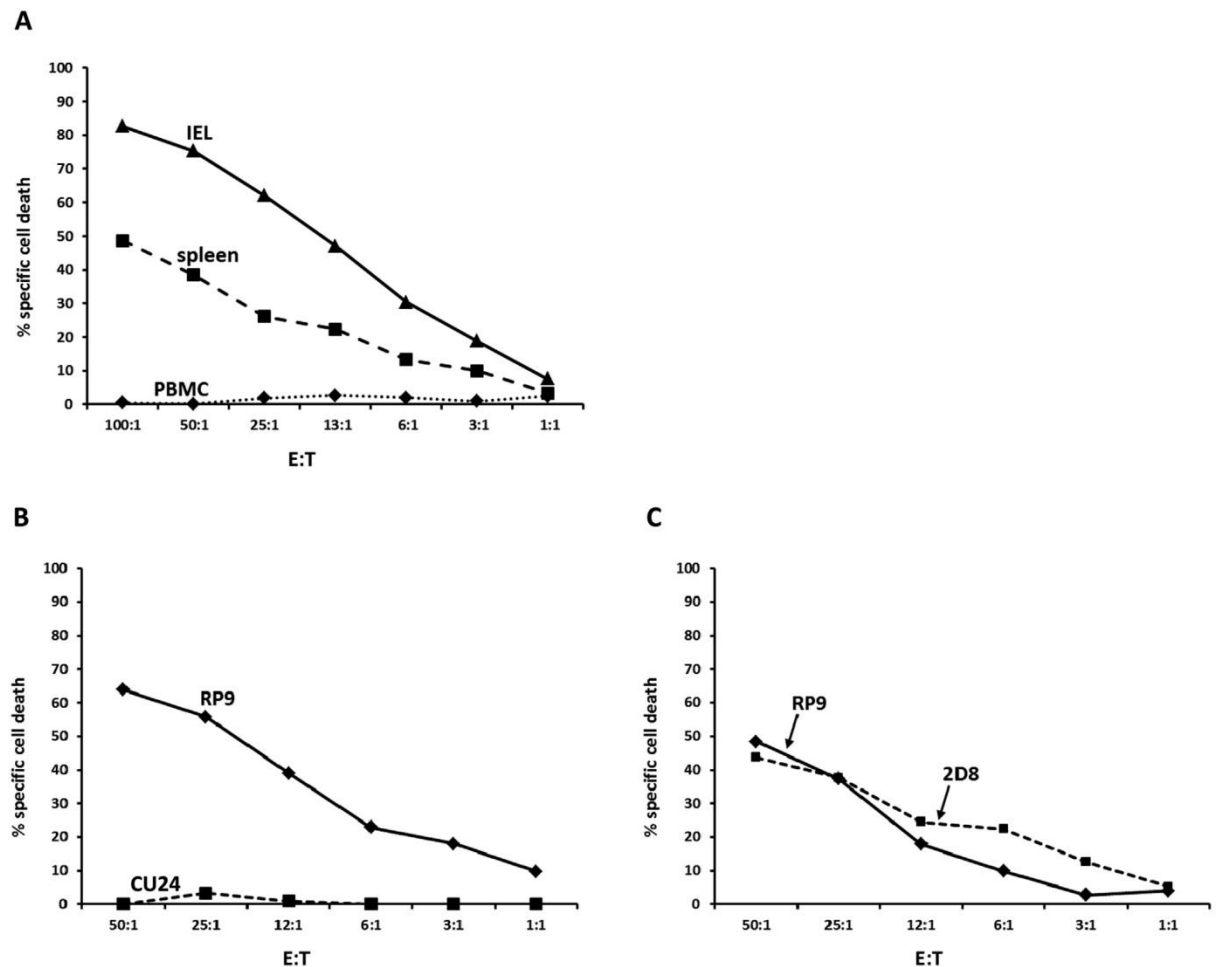


Fig. 2. Cytotoxicity depending on distinct effector and target cells. **A:** To compare spontaneous cytolytic potential of PBMC, splenocytes and IEL, the cells were directly used as effector cells in a log2 dilution and a cytotoxicity assay with RP9 as target cell line was performed. **B:** Splenocytes were stimulated with IL-2 and IL-12 for 96 h and afterwards their dose-dependent cytotoxicity on RP9 and CU24 target cell lines was compared. **C:** Target cell lines with different MHC-background were used to investigate if cytotoxicity is MHC-restricted.

various studies have tried to study, identify and characterize NK cells. Although spontaneous cytolytic activity is detected in splenocytes, we were unable to phenotypically identify NK cells using a variety of markers (Neulen et al., 2015). Our findings now reveal that spontaneous cytotoxic function in the spleen is not exerted by NK cells, but CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells.

$\gamma\delta$ T cells have a broad array of effector functions that reflect their involvement in diverse physiological and pathophysiological processes. They can kill infected, activated or transformed cells through pathways that involve the engagement of death-inducing receptors, such as CD95 and TNF related apoptosis inducing ligand receptor (TRAILR), and the release of cytotoxic effector molecules such as perforin and granzymes (Helgason et al., 1992; Ostergaard et al., 1987; Rouvier et al., 1993). Thus, NK cells and $\gamma\delta$ T cells are cytolytic cells that use the same basic mechanisms for destroying their targets, although they are triggered by distinct receptors. From bovine studies it is known, that granzyme B, perforin, and FasL are expressed in WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells from PBMCs, and that FasL expression increases upon activation of these cells (Blumerman et al., 2007). Some of them, like Fas and FasL were

transcribed in $\gamma\delta$ T cells when chickens were stimulated with *Salmonella* species (Berndt et al., 2006).

We refined a system to examine the cytotoxic potential of chicken effector cells by flow cytometry. For this purpose we have used eFlour670⁺ for target cell labeling. Previously established flow based killing assays were based on CFSE, 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester or PKH67 green fluorescent cell Linker Kit for target cell labeling (Jansen et al., 2010; Wang et al., 2003). eFlour670⁺ is less toxic than CFSE to the target cells and more cost-efficient than PKH67.

We could reveal that 2D8 cells are a susceptible target cell line in addition to the LSCC-RP9 target cell line. This newly identified chicken target cell line will be useful in studying the mechanisms of how an effector cell recognizes its target and what triggers the cytotoxic responses. Up to now it is unknown which ligands are responsible for the susceptibility to cytotoxic function of different effector cells. In case of MHC restricted $\alpha\beta$ T cells, the expansion and functional differentiation requires concomitant engagement of the TCR and costimulatory receptors. In contrast, the mechanisms of T cell ligand recognition that result in T cell activation have not been

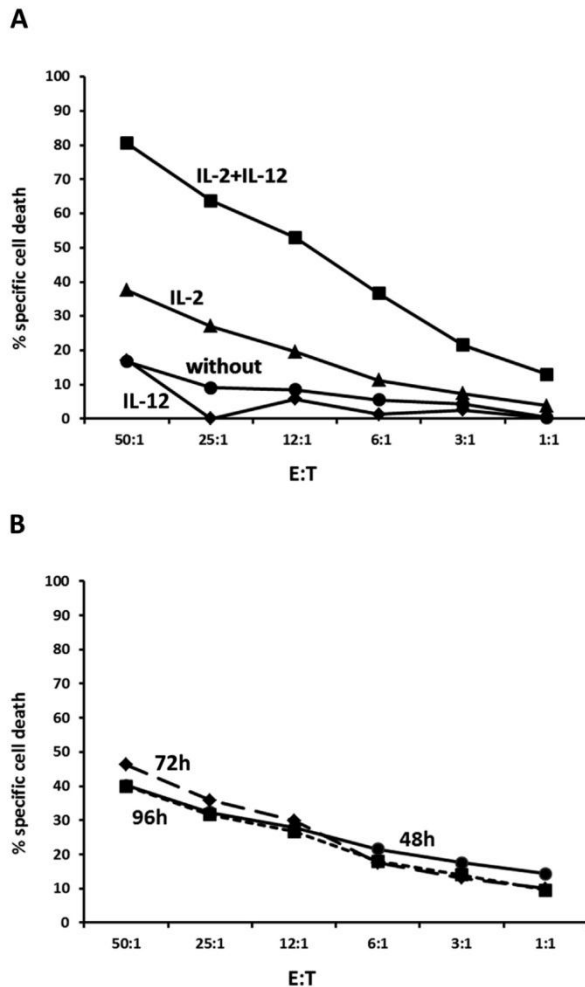


Fig. 3. Cytotoxicity depending on previous stimulation of effector cells. **A:** Splenocytes were stimulated with either IL-2 or IL-12, the combination of both, or remained unstimulated for 48 h and were used in the cytotoxicity-assay against RP9 in log2 dilution. **B:** Splenocytes of one individual were stimulated with the combination IL-2 and IL-12 for 48, 72 and 96 h prior performing the cytotoxicity-assay to investigate time-dependent alterations.

exploited for chicken $\gamma\delta$ T cells.

Chicken NK cells are involved in response to Marek's disease and influenza (Jansen et al., 2013; Sharma, 1981). A few infection models have demonstrated the involvement of chicken blood and tissue $\gamma\delta$ T cells in immune responses to *Salmonella* species and *Eimeria*, but so far, the nature of antigens recognized by chicken $\gamma\delta$ T cell populations has remained elusive. We have demonstrated that both, NK cells and $\gamma\delta$ T cells within IEL and spleen exert spontaneous cytotoxic function. It is likely that chicken NK cells and $\gamma\delta$ T cells are engaged to interact with particular structures of evolutionarily selective importance. Chicken $\gamma\delta$ T cells could be an example of convergent evolution as they might have taken over functional characteristics usually associated with NK cells.

In mammals $\gamma\delta$ T cells and NK cells share some similarities and develop from a common progenitor. For example a high Id2:E protein ratio is a hallmark of NK cells leading to the development of NK cells but it was shown to promote rearrangement of the V γ segment of V γ 3 δ 5 cells as well (Bain et al., 1999; De Creus et al., 2002; Mjosberg et al., 2012). Mammalian $\gamma\delta$ T cell growth is supported with another striking NK-like feature, namely the IL-2/IL-15 receptor complex. Furthermore mouse V γ 1.1 V δ 6.3 cells have been shown to express the NK cell marker NK1.1 and they express the transcription factor promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) which is responsible for gene regulation in NK cells and innate lymphoid cells as well (Alonzo et al., 2010; Kreslavsky et al., 2009; Verykokakis et al., 2010). Chicken $\gamma\delta$ T cells co-express CRTAM (CD355), a marker which is also detectable on human NK cells (Zechmann et al., 2013).

Lymphokine-activated-killer cells (LAKs) are a heterogeneous population of cells consisting primarily of NK, NKT and T cells, which are generated in vitro by culture of peripheral blood mononuclear cells in IL-2 (Grimm et al., 1982). We have been able to enhance the lytic activity of chicken splenic $\gamma\delta$ T cells in a LAK similar manner by coculturing the cells with IL-2. Whereas IL-12 alone was not able to stimulate cytolytic ability the combination of IL-2 and IL-12 strongly induced the cytotoxicity of the effector cells. This cytokine combination is well known to trigger mammalian NK cell function. Taken together, chicken $\gamma\delta$ T cells could represent an NK similar "innate-like" subset of cells with its own distinctive set of versatile effector roles.

A shared feature of $\gamma\delta$ T cells across species is that they are able to fulfil various effector functions which are usually connected to different cell subsets like Th17, Th1, ILC1 and NK cells. Upon activation, $\gamma\delta$ T cells largely produce IFN γ and IL-17 (Poggi et al., 2009; Shibata et al., 2014). Our lab recently developed a tool to measure

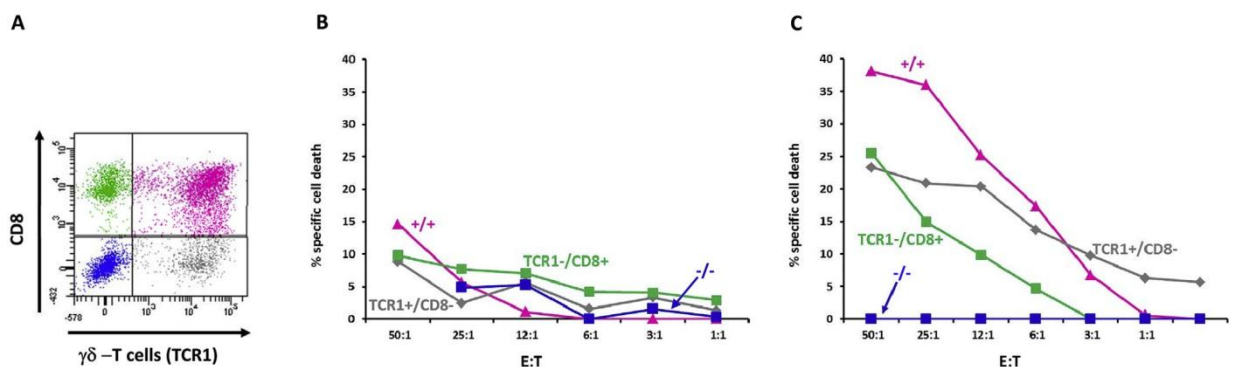


Fig. 4. Cytotoxic potential of effector cell subpopulations. **A:** Splenocytes were sorted for TCR1 and CD8 and subsequently TCR1⁺/CD8⁺, TCR1⁺/CD8⁻ and TCR1⁻/CD8⁻ cells were used for the cytotoxicity assay without stimulation (**B**) or were stimulated with IL-2 and IL-12 for 48 h before the assay (**C**).

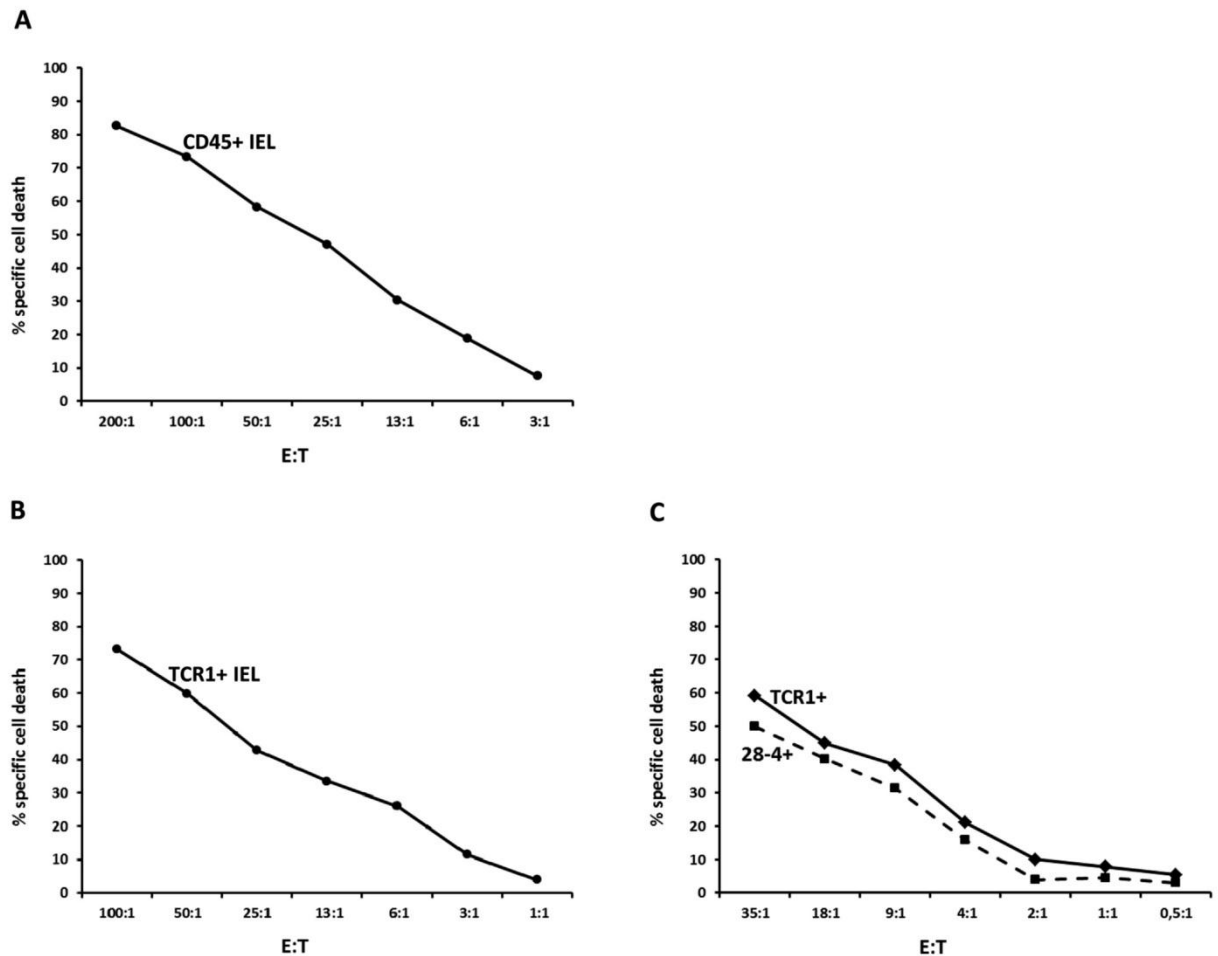


Fig. 5. Cytotoxic potential of effector cell subpopulations. A: Cytotoxicity of unstimulated CD45⁺ MACS separated IEL cells. B: TCR1⁺ MACS separated IEL cells. C: Cytotoxicity of unstimulated TCR1⁺ compared to 28–4⁺ MACS separated IEL cells.

IL-17 cytoplasmic cytokine staining (Walliser and Gobel, 2017) which revealed a high frequency of cytoplasmic TCR1⁺ IL-17⁺ cells. Based on several phenotypic and functional characteristics comparable to NK cells $\gamma\delta$ T cells are categorized as “innate-like” cells. They might have had an evolutionary advantage over NK cells since they are able to respond in several different ways and therefore might have been more successful at the interface of the innate and adaptive immune response.

In this regard it is of special interest, that chicken harbor spontaneous cytotoxic NK cell (28–4⁺) as well as $\gamma\delta$ T cell (TCR1⁺) population within IEL. For some reasons it might have been an advantage to have two innate killer subsets within the intestine tissue triggered by different inflammatory stimuli. To determine the physiologic roles of these distinct IEL subsets in more detail further studies involving phenotype, functional characteristics, receptors and ligands as well as gene profiles are essential.

In mammals, individual $\gamma\delta$ T cell subsets within the population have restricted effector properties. Human V γ 9V δ 2 cells for example are the predominant population within peripheral blood and so far the only known subset responding to foreign and self-phosphoantigens (Kabelitz and He, 2012; Morita et al., 2007). On the other hand subsets that localize in epithelial associated tissues

at sites of inflammation are functionally very different from circulating $\gamma\delta$ T cells. Chicken have a lot of $\gamma\delta$ T cells within peripheral blood and show rather high numbers of $\gamma\delta$ T cells in the tissue (spleen and IEL) as well. This raises the question if chicken $\gamma\delta$ T cells can be divided into several subsets regarding function, co-receptor expression and TCR diversity. So far the strict association of certain invariant $\gamma\delta$ T cells to epithelial tissues could not be detected for the chicken, thus suggesting that various $\gamma\delta$ T cell subsets are present throughout the peripheral tissues.

The TCR coreceptor CD8 exists either as CD8 $\alpha\beta$ heterodimer or as CD8 $\alpha\alpha$ homodimer. The CD8 $\alpha\alpha$ isoform lacks signaling motifs but could function as an adhesion molecule able to strengthen the interaction with the $\gamma\delta$ T cell ligands (Miceli et al., 1991; Workman and Vignali, 2005). It was shown within blood and tissue $\gamma\delta$ T cells that those cells expressing CD8 $\alpha\alpha$ co-receptor strongly proliferate in response to Salmonella infection (Pieper et al., 2008). This CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ population might represent a special subset of CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells within blood and tissues that respond primarily to bacterial antigens.

We were not able to detect any differences when comparing CD8 $\alpha\alpha$ and CD8 $\alpha\beta$ responding $\gamma\delta$ T cells (in response to IL-2 and IL-12) (data not shown). On the other hand CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells show an

activated innate like phenotype as they show the highest cytotoxic activity within the $\gamma\delta$ T cell population. Additionally, we have recognized that $CD8^+$ $\gamma\delta$ T cells co-express SLAMF4 (Straub et al., 2014) and upon stimulation with IL-2 upregulate CRTAM (Zechmann et al., 2013).

We have noted impressive differences of cytotoxic function among tissues as chicken $\gamma\delta$ T cell population in peripheral blood did not exert cytotoxic function at all, splenic $\gamma\delta$ T cells exert cytotoxic function to some extent and the strongest response could be detected within IEL population. Further studies will help to determine the antigen recognition requirements and the distribution of different $\gamma\delta$ T cell subsets to study and understand their role in inflammation and disease.

In conclusion we have optimized a tool to measure cytotoxic activity and were able to detect remarkable differences within $\gamma\delta$ T cells populations in different tissues. The strongest spontaneous response was exerted by intestinal $\gamma\delta$ T cell population and $28-4^+$ NK cell populations. Spontaneous cytotoxic function within spleen could be enhanced by the co-culture with IL-2 and IL-12 cytokines and the origin of strongest lytic response was identified as $CD8^+$ $\gamma\delta$ T cell subset.

Funding

Funded by DFG grant GO489/5-2.

References

- Abate, G., Spencer, C.T., Hamzabegovic, F., Blazevic, A., Xia, M., Hoft, D.F., 2015. Mycobacterium-specific gamma9delta2 T cells mediate both pathogen-inhibitory and CD40 ligand-dependent antigen presentation effects important for tuberculosis immunity. *Infect. Immun.* 84, 580–589.
- Alonzo, E.S., Gottschalk, R.A., Das, J., Egawa, T., Hobbs, R.M., Pandolfi, P.P., Pereira, P., Nichols, K.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S., Sant'Angelo, D.B., 2010. Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *Journal of immunology*. Baltimore, Md. 190 (184), 1268–1279.
- Bain, G., Romanow, W.J., Albers, K., Havran, W.L., Murre, C., 1999. Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. *J. Exp. Med.* 189, 289–300.
- Berndt, A., Pieper, J., Methner, U., 2006. Circulating $\gamma\delta$ T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect. Immun.* 74, 3967–3978.
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., Koup, R.A., 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific $CD8^+$ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* 281, 65–78.
- Blumerman, S.L., Herzig, C.T., Wang, F., Coussens, P.M., Baldwin, C.L., 2007. Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ gammadelta and CD4+ alphabeta T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen. *Mol. Immunol.* 44, 2023–2035.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., Born, W.K., 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews. Immunology* 10, 467–478.
- Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B., 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14, 181–196.
- Caro, M.R., Gallego, M.C., Buendia, A.J., Navarro, E., Navarro, J.A., 1998. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. *Res. Veterinary Sci.* 65, 145–148.
- Choi, K.D., Lillehoj, H.S., 2000. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 73, 309–321.
- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402.
- De Creus, A., Van Beneden, K., Stevens, F., Debacker, V., Plum, J., Leclercq, G., 2002. Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *Journal of immunology*. Baltimore, Md. 168 (168), 6486–6493.
- Degen, W.G., van Daal, N., van Zuilekom, H.L., Burnside, J., Schijns, V.E., 2004. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *Journal of immunology*. Baltimore, Md. 172 (172), 4371–4380.
- Gobel, T.W., 2000. Isolation and analysis of natural killer cells in chickens. *Methods Mol. Biol. Clift. N.J.* 121, 337–345.
- Gobel, T.W., Chen, C.H., Cooper, M.D., 1996. Expression of an avian CD6 candidate is restricted to alpha beta T cells, splenic $CD8^+$ gamma delta T cells and embryonic natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 1743–1747.
- Gobel, T.W., Chen, C.L., Shrimpf, J., Grossi, C.E., Bernot, A., Bucy, R.P., Auffray, C., Cooper, M.D., 1994. Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *Eur. J. Immunol.* 24, 1685–1691.
- Gobel, T.W., Kaspers, B., Stangassinger, M., 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int. Immunol.* 13, 757–762.
- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., Rosenberg, S.A., 1982. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155, 1823–1841.
- Hatam, L., Schuval, S., Bonagura, V.R., 1994. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry* 16, 59–68.
- Hayday, A.C., 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975–1026.
- Helgason, C.D., Prendergast, J.A., Berke, G., Bleackley, R.C., 1992. Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinases and perforin. *Eur. J. Immunol.* 22, 3187–3190.
- Herzig, C.T., Waters, R.W., Baldwin, C.L., Telfer, J.C., 2010. Evolution of the CD163 family and its relationship to the bovine gamma delta T cell co-receptor WC1. *BMC Evol. Biol.* 10, 181.
- Holderness, J., Hedges, J.F., Ramstead, A., Jutila, M.A., 2013. Comparative biology of gammadelta T cell function in humans, mice, and domestic animals. *Annu. Rev. Animal Biosci.* 1, 99–124.
- Jansen, C.A., de Geus, E.D., van Haarlem, D.A., van de Haar, P.M., Londt, B.Z., Graham, S.P., Gobel, T.W., van Eden, W., Brookes, S.M., Vervelde, L., 2013. Differential lung NK cell responses in avian influenza virus infected chickens correlate with pathogenicity. *Sci. Rep.* 3, 2478.
- Jansen, C.A., van de Haar, P.M., van Haarlem, D., van Kooten, P., de Wit, S., van Eden, W., Vierterbock, B.C., Gobel, T.W., Vervelde, L., 2010. Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 759–767.
- Kabelitz, D., He, W., 2012. The multifunctionality of human Vgamma9Vdelta2 gammadelta T cells: clonal plasticity or distinct subsets? *Scand. J. Immunol.* 76, 213–222.
- Khairallah, C., Netzer, S., Villacres, A., Juzan, M., Rousseau, B., Dulanto, S., Giese, A., Costet, P., Praloran, V., Moreau, J.F., Dubus, P., Vermijlen, D., Dechanet-Merville, J., Capone, M., 2015. Gammadelta T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV). *PLoS Pathog.* 11, e1004702.
- Kim, G.G., Donnenberg, V.S., Donnenberg, A.D., Gooding, W., Whiteside, T.L., 2007. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h 51Cr-release assay. *J. Immunol. Methods* 325, 51–66.
- Kreslavsky, T., Savage, A.K., Hobbs, R., Gounari, F., Bronson, R., Pereira, P., Pandolfi, P.P., Bendelac, A., von Boehmer, H., 2009. TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12453–12458.
- Kubota, T., Wang, J., Gobel, T.W., Hockett, R.D., Cooper, M.D., Chen, C.H., 1999. Characterization of an avian (Gallus gallus domesticus) TCR alpha delta gene locus. *Journal of immunology*. Baltimore, Md. 163 (163), 3858–3866.
- Lillehoj, H.S., 1994. Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Res. Veterinary Sci.* 56, 1–7.
- Mackay, C.R., Hein, W.R., 1989. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol.* 1, 540–545.
- Maher, C.O., Dunne, K., Comerford, R., O'Dea, S., Loy, A., Woo, J., Rogers, T.R., Mulcahy, F., Dunne, P.J., Doherty, D.G., 2015. Candida albicans stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by Vdelta1 T cells. *Journal of immunology*. Baltimore, Md. 194 (194), 5953–5960.
- McClure, S.J., Hein, W.R., Yamaguchi, K., Dudley, L., Beya, M.F., Miyasaka, M., 1989. Ontogeny, morphology and tissue distribution of a unique subset of CD4-CD8-sheep T lymphocytes. *Immunol. Cell Biol.* 67 (Pt 4), 215–221.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Stella, G., Postema, C.E., Thompson, C.B., 1991. Chicken T-cell receptor beta-chain diversity: an evolutionarily conserved D beta-encoded glycine turn within the hypervariable CDR3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7699–7703.
- Miceli, M.C., von Hoegen, P., Parnes, J.R., 1991. Adhesion versus coreceptor function of CD4 and CD8: role of the cytoplasmic tail in coreceptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2623–2627.
- Mjosberg, J., Bernink, J., Peters, C., Spits, H., 2012. Transcriptional control of innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 1916–1923.
- Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., Wang, H., 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* 215, 59–76.
- Neulen, M.L., Gobel, T.W., 2012. Chicken CD56 defines NK cell subsets in embryonic spleen and lung. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 410–415.
- Neulen, M.L., Vierterboeck, B.C., Straub, C., Gobel, T.W., 2015. Identification of novel chicken CD4(+) CD3(-) blood population with NK cell like features. *Dev. Comp. Immunol.* 49, 72–78.
- Ostergaard, H.L., Kane, K.P., Mescher, M.F., Clark, W.R., 1987. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* 330, 71–72.
- Pauza, C.D., Poonia, B., Li, H., Cairo, C., Chaudhry, S., 2014. Gammadelta T cells in HIV

- disease: past, present, and future. *Front. Immunol.* 5, 687.
- Phillips, J.H., Weiss, A., Gemlo, B.T., Rayner, A.A., Lanier, L.L., 1987. Evidence that the T cell antigen receptor may not be involved in cytotoxicity mediated by gamma/delta and alpha/beta thymic cell lines. *J. Exp. Med.* 166, 1579–1584.
- Pieper, J., Methner, U., Berndt, A., 2008. Heterogeneity of avian gammadelta T cells. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 124, 241–252.
- Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary Res.* 39, 54.
- Piriou, L., Chilmonec, S., Genetet, N., Albina, E., 2000. Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry* 41, 289–297.
- Poggi, A., Catellani, S., Musso, A., Zocchi, M.R., 2009. Gammadelta T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 in response to *Candida albicans* or mycobacterial antigens: possible implications for acute and chronic inflammation. *Curr. Med. Chem.* 16, 4743–4749.
- Puehler, F., Gobel, T., Breyer, U., Ohnemus, A., Staeheli, P., Kaspers, B., 2003. A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma. *J. Immunol. Methods* 274, 229–232.
- Rogers, S.L., Vierterboeck, B.C., Gobel, T.W., Kaufman, J., 2008. Avian NK activities, cells and receptors. *Seminars Immunol.* 20, 353–360.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Golstein, P., 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177, 195–200.
- Sarrias, M.R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., Lozano, F., 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 24, 1–37.
- Schat, K.A., Chen, C.L., Calnek, B.W., Char, D., 1991. Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J. virology* 65, 1408–1413.
- Sharma, J.M., 1981. Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens. *Avian Dis.* 25, 882–893.
- Sharma, J.M., Okazaki, W., 1981. Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis and effect of antithymocyte serum on effector cells. *Infect. Immun.* 31, 1078–1085.
- Shekhar, S., Milling, S., Yang, X., 2012. Migration of gammadelta T cells in steady-state conditions. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 147, 1–5.
- Shibata, K., Yamada, H., Nakamura, M., Hatano, S., Katsuragi, Y., Kominami, R., Yoshikai, Y., 2014. IFN-gamma-producing and IL-17-producing gammadelta T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. *Journal of immunology. Baltim. Md.* 1950 (192), 2210–2218.
- Sowder, J.T., Chen, C.L., Ager, L.L., Chan, M.M., Cooper, M.D., 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J. Exp. Med.* 167, 315–322.
- Straub, C., Neulen, M.L., Sperling, B., Windau, K., Zechmann, M., Jansen, C.A., Vierterboeck, B.C., Gobel, T.W., 2013. Chicken NK cell receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 324–333.
- Straub, C., Neulen, M.L., Vierterboeck, B.C., Gobel, T.W., 2014. Chicken SLAMF4 (CD244, 2B4), a receptor expressed on thrombocytes, monocytes, NK cells, and subsets of alphabeta-, gammadelta- T cells and B cells binds to SLAMF2. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 159–168.
- Su, C., Jakobsen, I., Gu, X., Nei, M., 1999. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 50, 301–308.
- Sutton, C.E., Mielke, L.A., Mills, K.H., 2012. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 2221–2231.
- Verykokakis, M., Boos, M.D., Bendelac, A., Adams, E.J., Pereira, P., Kee, B.L., 2010. Inhibitor of DNA binding 3 limits development of murine slam-associated adaptor protein-dependent "innate" gammadelta T cells. *PLoS One* 5, e9303.
- Vierterboeck, B.C., Gobel, T.W., 2007. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 119, 137–141.
- Vitale, M., Neri, L.M., Comani, S., Falcieri, E., Rizzoli, R., Rana, R., Papa, S., 1989. Natural killer function in flow cytometry. II. Evaluation of NK lytic activity by means of target cell morphological changes detected by right angle light scatter. *J. Immunol. Methods* 121, 115–120.
- Walliser, I., Gobel, T.W., 2017. Generation of glycosylphosphatidylinositol linked chicken IL-17 to generate specific monoclonal antibodies applicable for intracellular cytokine staining. *Dev. Comp. Immunol.* 73, 27–35.
- Wang, Y., Korkeamaki, M., Vainio, O., 2003. A novel method to analyze viral antigen-specific cytolytic activity in the chicken utilizing flow cytometry. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 95, 1–9.
- Workman, C.J., Vignali, D.A., 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *Journal of immunology. Baltim. Md.* 1950 (174), 688–695.
- Zechmann, M., Reese, S., Gobel, T.W., 2013. Chicken CRTAM binds nectin-like 2 ligand and is upregulated on CD8+ alphabeta and gammadelta T lymphocytes with different kinetics. *PLoS One* 8, e81942.

5 DISKUSSION

Seit zytotoxische Fähigkeiten in der Milz des Huhns entdeckt wurden, haben verschiedene Studien versucht die vermeintlich dafür verantwortlichen NK-Zellen nachzuweisen und zu charakterisieren [122]. Doch obwohl den Splenozyten im Huhn eindeutig zytolytische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, war es nicht möglich NK-Zellen phänotypisch als deren Quelle zu identifizieren [3].

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die spontane zytotoxische Aktivität in der Milz des Haushuhns nicht nur von NK-Zellen, sondern hauptsächlich von CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt wird, und dass diese Aktivität durch die vorhergegangene Stimulation mit den Zytokinen IL-2 und IL-12 enorm erhöht werden kann. Außerdem wurde die Zelllinie 2D8 als eine neue Zielzelllinie zur Untersuchung von zytotoxischen Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert. Durch die Verbesserung des Zytotoxizitäts-Assays speziell für Hühner-Effektor- und -Target-Zellen wurde ein Werkzeug generiert, um die zytolytischen Fähigkeiten von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen genauer zu untersuchen.

NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen entstehen aus den gleichen Vorläufer-Zellen. Dadurch ergeben sich einige phänotypische Ähnlichkeiten, es bestehen aber auch deutliche Unterschiede. Zunächst wurden aviäre NK-Zellen als CD8 positive Lymphozyten, denen TCR und Ig auf der Oberfläche fehlt, definiert und verschiedene Gewebe adulter Hühner wurden dahingehend untersucht [109]. Mithilfe der dadurch entdeckten Zellen im intestinalen Epithel wurde der mAk 28-4 generiert, der Zellen mit hohen zytolytischen Fähigkeiten anfärbte. Diese Zellen waren aber nur in einer sehr niedrigen Frequenz von 0,5 bis 1% nachweisbar, was sich deutlich von der Situation im Säuger unterscheidet, wo ca. 10% der Blutlymphozyten NK-Zellen sind [123]. Da aber mehrfach NK-Zell-Aktivität in der Milz des Huhns nachgewiesen werden konnte, erschien es ungewöhnlich, dass Hühner so wenige NK-Zellen haben. Verschiedene NK-Zell-Marker, wie z.B. der für das C-Typ-Lektin B-NK, färben neben embryonalen, IL-2-expandierten TCR0-Zellen ebenso eine Subgruppe von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut an [124]. Auch CRTAM (CD355), ein Marker für humane NK-Zellen, wird auf IL-2-stimulierten Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Milz coexprimiert [125]. Aufgrund dieser Beobachtung ergaben sich zwei Möglichkeiten: entweder haben Hühner eigentlich mehr NK-Zellen und diese lassen sich mit den bisher vorhandenen Antikörpern noch nicht

eindeutig nachweisen, oder sie haben tatsächlich wesentlich weniger NK-Zellen als Säuger und deren Aufgaben werden von anderen Zellen übernommen. Mit dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass letzteres der Fall ist.

Trotz intensiver Forschung zur aviären NK-Zell-Aktivität – mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen – ist bislang nicht eindeutig bewiesen worden, ob NK-Zellen im Krankheitsgeschehen von Geflügel überhaupt eine entscheidende Rolle spielen. Nachweise funktioneller NK-Zell-Aktivität waren in verschiedenen Infektionsmodellen möglich, allerdings blieben die Zellen, die die spontane Zytotoxizität mediierten, schwer zu identifizieren. Es kann vermutet werden, dass ihre Aufgaben zumindest im Bereich der Zytotoxizität im Huhn von den $\gamma\delta$ -T-Zellen abgedeckt werden [123].

Die verschiedenen Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen, deren ganze Bandbreite sicher noch nicht bekannt ist, überschneiden sich mit denen von NK-Zellen. $\gamma\delta$ -T-Zellen können infizierte, aktivierte oder transformierte Zellen erkennen und abtöten. Dazu nutzen sie verschiedene Mechanismen, insbesondere Zelltod-induzierende Rezeptoren, wie CD95 (Fas) und TNF related apoptosis inducing ligand receptors (TRAILR) [126, 127], sowie die Ausschüttung von zytotoxischen Effektormolekülen, wie Perforin und Granzym [128]. Sie sind also genau wie NK-Zellen zytolytische Zellen und beide nutzen die gleichen Grundmechanismen für die Zerstörung ihrer Zielzellen. Allerdings unterscheiden sich die Rezeptoren, über die sie aktiviert werden. In bovinen WC1 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen, isoliert aus PBMCs, konnte eine Expression von Granzym B, Perforin und FasL nachgewiesen werden, wobei sich insbesondere die Expression von FasL nach Aktivierung dieser Zellen erhöhte [129]. Auch in CD8 positiven Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen war eine erhöhte Expression von Fas und FasL auf mRNA-Ebene nach Stimulation der Zellen mit Salmonellen nachweisbar [92]. Allen $\gamma\delta$ -T-Zellen in verschiedenen Spezies ist gemein, dass sie vielseitige Effektorfunktionen ausführen können, die mit anderen Zelltypen in Zusammenhang stehen, wie z.B. T_H17 -, T_H1 - und NK-Zellen. Nach Aktivierung können sie beispielsweise $IFN\gamma$, das antiviral wirkt, und IL-17, ein Zytokin das die Rekrutierung von Neutrophilen induziert, produzieren [130, 131].

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen beim Rind ebenfalls eine wichtige Rolle als Killerzellen, da sie Granulysin [132] und Perforin [133] exprimieren. Die *ex vivo* Expression von Perforin ist vor allem bei jungen Tieren detektierbar, nimmt aber dann deutlich ab; sie ist unabhängig von einer Antigen-Stimulierung oder $IFN\gamma$. Es scheint also als würde das

unreife Immunsystem von Kälbern eine Population an $\gamma\delta$ -T-Zellen mit „Natürlicher-Killer“-Phänotyp ausbilden, die mit der Zeit verschwinden [134]. Eine altersabhängige Änderung der Perforin-Expression wurde auch für bovine NK-Zellen beschrieben [135]. Schweine besitzen ebenfalls $\gamma\delta$ -T-Zellen, die MHC-unabhängig und spontan zytotoxisch agieren können [136]. Ob sich die spontane Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Huhn altersabhängig verändert wurde noch nicht untersucht; in dieser Arbeit stammten alle Hühner aus einer ähnlichen Altersgruppe.

Für Säuger- $\gamma\delta$ -T-Zellen sind bereits einige Liganden des TCRs bekannt. Die humanen $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen, welche im Blut von Erwachsenen zwischen 50 und 95% der $\gamma\delta$ -T-Zell-Population ausmachen [36], erkennen mit ihrem Rezeptor phosphorylierte Zwischenstufen des Nicht-Mevalonat-Weges der Isoprenoid-Biosynthese, insbesondere (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylpyrophosphat (HMB-PP) [137]. Dieser Metabolit kommt in Pflanzen und vielen Bakterien inklusive Pathogenen, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, vor, nicht jedoch in Tieren [138]. Strukturell-verwandte Pyrophosphate können im Menschen auch während Infektionen oder zellulären Dysregulationen auftreten, was die entscheidende Rolle der $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen in der anti-infektiven und anti-tumoralen Immunabwehr erklärt [139]. Für murine $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde u.a. Cardiolipin und strukturell ähnliche Phospholipide als Liganden entdeckt [140]. Die Liste der Liganden für Säuger- $\gamma\delta$ -T-Zellen wächst derzeit stetig [6].

Die Liganden der Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen sind dagegen noch gänzlich unbekannt. Durch die Generierung stabiler Zelllinien mit unterschiedlichen Versionen des $\gamma\delta$ -TCRs auf der Oberfläche – $V\gamma 1$, $V\gamma 2$ oder $V\gamma 3$ – wird momentan versucht sie zu identifizieren. Mithilfe von Reporterzelllinien wie BWZ.36, die stabil mit den unterschiedlichen $\gamma\delta$ -TCR-Versionen transfiziert werden, dürften Liganden der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen bald ausfindig gemacht werden. Außerdem könnten nach Immunisierung von Mäusen mit diesen stabilen $\gamma\delta$ -TCR-Zelllinien mittels Fusion $V\gamma$ -spezifische Antikörper generiert werden, um die Gewebeverteilung verschiedener $\gamma\delta$ -TCR-Varianten im Huhn zu untersuchen. Bislang konnten keine gewebespezifischen Prävalenzen bestimmter $\gamma\delta$ -TCR-Versionen nachgewiesen werden, da sie aber im Säuger vorliegen, lassen sie sich auch im Geflügel vermuten.

Bislang ist unklar durch welche Strukturen auf der Oberfläche ihrer Zielzellen aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen aktiviert werden. Die LSCC-RP9-Zielzellen haben einen genetischen MHC-Hintergrund von B^2B^{15} [141] und entsprechen damit dem der verwendeten Effektorzellen von M11-Hühnern mit B^2B^2 . Die Erkennung der Targetzellen durch

$\gamma\delta$ -T-Zellen erfolgt dennoch MHC-unabhängig, wie in dieser Arbeit durch die Verwendung von Zielzellen mit unterschiedlichem MHC-Hintergrund, welche aber gleichermaßen abgetötet werden konnten, gezeigt wurde. Außerdem hatte die Präinkubation der RP9-Targetzellen mit dem anti-Hühner-MHCI-Antikörper F21-2 keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen (siehe Abbildung 4). Auch die $\gamma\delta$ -T-Zellen von Säugern agieren, im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen, MHC-unabhängig [5].

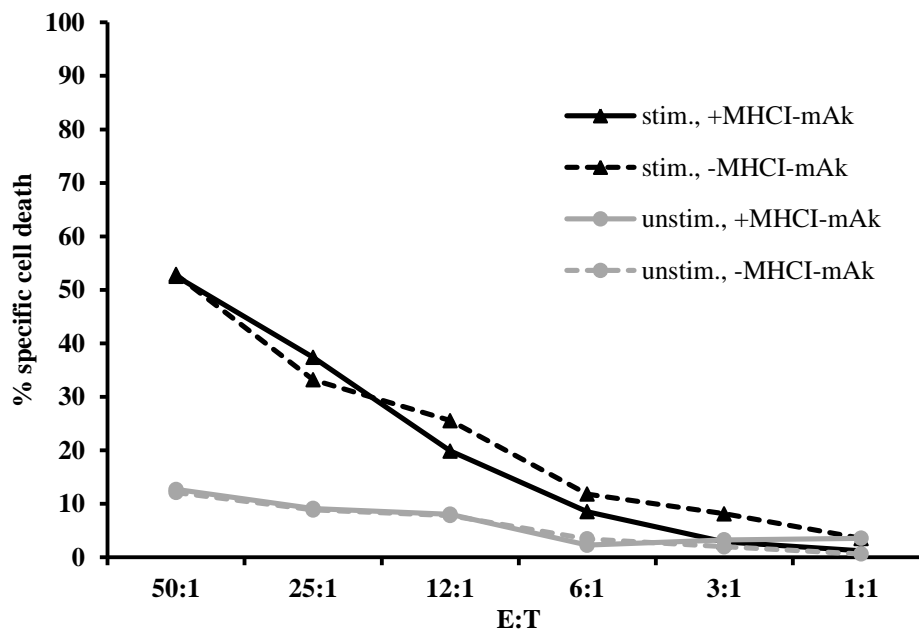


Abbildung 4: MHC-I-unabhängige Zytotoxizität

Einsatz von IL-2 plus IL-12-stimulierten bzw. unstimulierten Milzzellen mit und ohne Zugabe von MHC-I-mAk im Zytotoxizitäts-Assay

Die Hühner-B-Zelllinie B19-2D8 wurde ursprünglich zur Untersuchung der IL18-induzierten IFN- γ -Freisetzung entwickelt [142]. Diese Zelllinie wurde bereits als Targetzelllinie im Zytotoxizitäts-Assay mit Hühner-NK-Zellen genutzt; sie ließ sich dabei durch die verwendeten embryonalen Milzzellen aber nicht abtöten [120]. 2D8-Zellen haben einen genetischen MHC-Hintergrund von B¹⁹B¹⁹ [142], konnten von den $\gamma\delta$ -T-Zellen der Milz dementsprechend MHC-unabhängig lysiert werden. Die genauere Charakterisierung der neuen Zielzelllinie 2D8 könnte hilfreich sein, um den Mechanismus, mit dem $\gamma\delta$ -T-Zellen ihre Targetzellen erkennen, aufzuklären. Die Hühner-T-Zelllinie MDCC-CU24, mit einem genetische Hintergrund bezüglich MHC von B¹⁹C² [141], konnte dagegen von $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Milz nicht abgetötet werden.

Interessanterweise sind die CU24-Zellen mit dem Marek-Virus transfiziert, einem Virus, der im Geflügel unter anderem Tumore entstehen lässt [143]. Es könnte also sein, dass auf der Oberfläche von Zielzellen sowohl Liganden für hemmende als auch für aktivierende Rezeptoren vorhanden sind. Bei resistenten Zelllinien, wie der CU24-Linie, könnte der Einfluss der hemmenden Liganden überwiegen und so eine Zielzelllyse verhindern. Ein Vergleich der Oberflächenstrukturen von RP9-, 2D8- und CU24-Zellen sollte Hinweise geben auf mögliche Liganden des $\gamma\delta$ -TCRs.

Für erste Untersuchungen der Zytotoxizität entwickelten Brunner et al. 1968 den Chromium-release-Assay [144]. Dessen Nachteile, wie der gesundheitsschädliche und teure Umgang mit radioaktiven Materialien, wurden durch die Entwicklung des Zytotoxizitäts-Assays unter Einsatz der Durchflusszytometrie von Piriou et al. umgangen [145]. Für die Identifizierung der Effektor- und Targetzellen wurden verschiedene Farbstoffe verwendet, die Differenzierung in lebende und tote Zellen erfolgte mittels PI. Durch die Weiterentwicklung des durchflusszytometrischen Zytotoxizitäts-Assays und die Anpassung an Hühner-Zielzellen ist die weitere Untersuchung der zytolytischen Fähigkeiten der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen leicht realisierbar. Der dabei genutzte Farbstoff für die Zielzell-Markierung, eFlour670⁺, ist weniger toxisch für Targetzellen als das üblicherweise genutzte CFSE [120] und günstiger als PKH67 [146], welches bisher auch für Zytotoxizitäts-Assays verwendet wurde.

In der weiteren Untersuchung der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden verschiedene Antikörper verwendet, um die beteiligten Strukturen sowohl auf den Effektor- als auch auf den Targetzellen zu identifizieren. Der mAk 20E5 – generiert nach Immunisierung mit CD8 positiven/CD3 negativen Splenozyten, die zuvor *in vitro* mit IL-2 kultiviert wurden [120] – war in wiederholten Versuchen in der Lage die zytotoxischen Fähigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl gegenüber den klassischen Zielzellen RP9, als auch gegenüber der neuen Zielzelllinie 2D8, deutlich zu erhöhen (siehe Abbildung 5). Dass der mAk 20E5 dabei selbst auf der Zielzelllinie RP9 binden könnte, wurde zuvor mittels Oberflächenfärbung ausgeschlossen, sodass sein Einfluss definitiv auf die Milzzellen begrenzt ist. Eine genaue Charakterisierung des mAk 20E5 steht noch aus, er zeigte aber bereits in früheren Chromium-release-Assays Zytotoxizitäts-steigernde Effekte auf IL-2-stimulierten Splenozyten als Effektorzellen.

Beim Einsatz verschiedener anderer mAk, die in einer Fusion nach Immunisierung mit Langzeit-kultivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen entstanden [147], wurden sowohl steigernde als auch vereinzelt hemmende Effekte auf die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ -T-Zellen aus der Milz

beobachtet. Hier bieten sich noch viele Möglichkeiten zur genaueren Untersuchung der an der Zielzell-Erkennung beteiligten Strukturen.

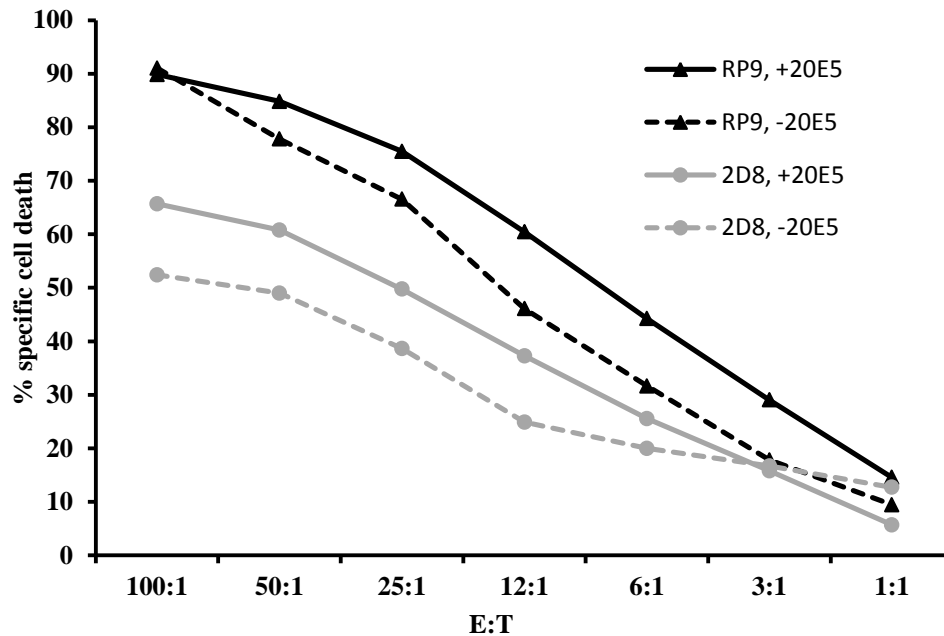


Abbildung 5: Einfluss des mAks 20E5 auf die Zytotoxizität

Verwendung der Zielzellen RP9 und 2D8 im Zytotoxizitäts-Assay mit und ohne Zugabe des mAk 20E5

Merkle et al. stellten 1992 in Untersuchungen mit REV-infizierten Hühnern fest, dass an der virus-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten-Antwort in der Milz hauptsächlich $\alpha\beta$ -T-Zellen und kaum $\gamma\delta$ -T-Zellen beteiligt sind, obwohl diese durchaus zahlreich unter den Splenozyten zu finden sind [148]. Die zytolytische Aktivität der $\alpha\beta$ -T-Zellen war dabei MHC-abhängig und nur gegenüber ebenfalls mit REV infizierten Zielzellen nachweisbar, nicht jedoch gegenüber primären Targetzellen. Setzt man Merckles Erkenntnisse mit denen aus dieser Arbeit in Kontext, lässt sich vermuten, dass die funktionelle Prävalenz der jeweiligen T-Zell-Subgruppe im Huhn abhängig ist vom Immun- bzw. Infektionsstatus des Tieres und dass insbesondere bei RE-Virus-Infektionen die zytotoxische Aktivität der $\alpha\beta$ -T-Zellen überwiegt. Hingegen wurde die Bedeutung von zytotoxischen $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Virusinfektionen im Säuger bereits durch Versuche mit dem CMV in der Ratte [149], sowie bei der chronischen Hepatitis C des Menschen belegt [150]. Dass aviäre $\gamma\delta$ -T-Zellen aber zumindest bei bakteriellen Infektionen eine entscheidende Rolle spielen, lässt sich aus zwei Untersuchungen von Berndt et al. [91, 92] ableiten, da sich hier sowohl die Anzahl der CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen im zirkulierenden Blut als auch in verschiedenen Geweben

infolge von Salmonellen-Infektionen stark erhöhte. Auch auf eine parasitäre Infektion mit Eimerien reagieren Hühner mit einer erhöhten $\gamma\delta$ -T-Zell-Frequenz [121]. Das Immunsystem scheint sich mittels zytotoxischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen für verschiedene Infektionsszenarien gewappnet zu haben, wobei die genaue Rolle der beiden Zelltypen im gesunden Tier sowie in verschiedenen Infektionsmodellen noch differenzierter untersucht werden muss. Auch die Beschaffenheit der Antigene, die von $\gamma\delta$ -T-Zellen auf diesen verschiedenen Pathogenen erkannt werden, ist noch zu eruieren.

Pieper et al. zeigten, dass unter den $\gamma\delta$ -T-Zellen in Blut und Gewebe während der Immunantwort auf eine Salmonella-Infektion diejenigen stark proliferieren, die den CD8 $\alpha\alpha$ -Corezeptor tragen [151]. Diese Subpopulation könnte eine spezielle Untergruppe der CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen darstellen, die in erster Linie auf bakterielle Antigene reagiert. Da in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der CD8 positiven Zellen der Antikörper CT-8 genutzt wurde, welcher die α -Kette des CD8-Corezeptors detektiert, lässt sich leider keine Aussage bezüglich der Anteile der jeweiligen CD8-Formen unter den zytotoxischen $\gamma\delta$ -T-Zellen treffen. Dazu müssten nachfolgende Versuche mit dem Antikörper EP-42, der die β -Kette erkennt, durchgeführt werden.

Grimm et al. beschrieben bereits 1982 eine heterogene Zellpopulation, die durch *in vitro*-Kultivierung mit IL-2 von humanen PBLs entstand. Jene Zellpopulation war in der Lage sowohl primäre als auch kultivierte Tumorzellen abzutöten, obwohl diese Tumorzellen gegenüber der Lyse durch nicht-kultivierte NK-Zellen resistent waren. Diese Gruppe, die Grimm als „lymphokine-activated killers“ (LAK) bezeichnete [152], enthielt NK-, NKT-, und T-Zellen. Auch die zytotoxische Aktivität der Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen ließ sich durch Kultivierung der Splenozyten mit IL-2 steigern. Da durch Versuche unserer Arbeitsgruppe bekannt war, dass die Kultivierung von Splenozyten mit der Zytokin-Kombination von IL-2 und IL-12 zu reinen $\gamma\delta$ -T-Zellkulturen führt, wurde auch IL-12 für eine Präinkubation der Milzzellen vor Einsatz als Effektorzellen im Zytotoxizitäts-Assay genutzt. Dabei erwies sich IL-12 alleine als nicht geeignet um zytotoxische Effekte zu erhöhen. Die Kombination aus IL-2 und IL-12 hingegen steigerte die Zytotoxizität der Effektorzellen enorm. Diese Zytokin-Kombination ist an sich bekannt dafür, NK-Zell-Funktionen in Säugern auszulösen [153]. Dabei scheint die Kultivierung mit IL-12 die Expression der IL-2-Rezeptor- α -Kette (CD25), welche Teil des hoch-affinen IL-2-Rezeptors ist, zu induzieren. Dieser Rezeptor ist im Gegensatz zum niedrig-affinen Rezeptor IL-2/15R β (CD122), der auch einige andere Zytokine binden kann, nicht konstitutiv auf NK-Zellen vorhanden [154]. IL-2 wird von

aktivierten T-Zellen produziert, um die B- und T-Zell-Proliferation zu unterstützen und um Makrophagen zu stimulieren [155]. Auf Säuger-T-Zellen liegt der IL-2-Rezeptor im Ruhezustand der Zelle in der wenig affinen Form, bestehend aus β - und γ -Kette, vor. Ein Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen bei gleichzeitigen costimulatorischen Signalen aktiviert die T-Zelle, was die Synthese von IL-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors induziert, wodurch der nun heterotrimere IL-2-Rezeptor hochaffin wird [156]. Ob sich die Kultivierung in Anwesenheit von IL-2 und IL-12 auf die aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen über ebendiese Mechanismen auswirkt, muss noch näher untersucht werden. Die unterschiedlich lange Dauer der Stimulation von 48 bis 96 Stunden hatte zumindest keine divergierenden Auswirkungen auf die Steigerung der zytolytischen Effekte.

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass Hühner im Intestinum sowohl eine spontan zytotoxische 28-4 positive NK-Zell-Population als auch eine spontan zytotoxische TCR1 positive $\gamma\delta$ -T-Zell-Population als Teil ihrer IELs besitzen. Es muss also einen evolutionären Vorteil haben über zwei verschiedene Subpopulationen von Killerzellen im Darm zu verfügen, die vermutlich von unterschiedlichen Signalen aktiviert werden. Um allerdings die jeweilige Rolle der beiden Zelltypen in physiologischen sowie pathologischen Gegebenheiten zu bestimmen, müssen noch weitere Untersuchungen bezüglich Phänotyp, Funktionen und Liganden vorgenommen werden.

In Mäusen und Menschen wurden für $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedene wichtige Funktionen bei der Immunabwehr, sowohl von Infektionen als auch von Tumoren, entdeckt [57, 157]. Ihr Beitrag war dabei jeweils nicht redundant mit den Wirkungen der $\alpha\beta$ -T-Zellen, was eine Erklärung für ihre evolutionäre Coevolution liefern könnte. In der Humanmedizin werden in klinischen Studien bereits erfolgreich $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immuntherapie gegen Neoplasien verschiedenster Art eingesetzt [158, 159]. Am besten untersucht und am häufigsten verwendet wird dabei die Population der V γ 9V δ 2-T-Zellen, die *in vitro* unter anderem durch einen Metaboliten des Mevalonat-Weges (IPP) aktiviert wird, welcher auch von Tumorzellen exprimiert werden kann. Maus und Mensch zählen aber zu den Spezies mit niedriger Frequenz von $\gamma\delta$ -T-Zellen. Warum andere Spezies wie zum Beispiel Rinder, Schafe und Hühner hingegen einen viel höheren Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen haben, ist noch nicht geklärt. Da aber bei immer mehr Arten hohe Frequenzen an $\gamma\delta$ -T-Zellen gefunden werden (z.B. Schwein [39], Zebu [47] und Elch [48]), könnte die Fragestellung eventuell treffender lauten, warum Mensch

und Maus so wenige $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen.

Aufgrund vieler phänotypischer bzw. funktioneller Ähnlichkeiten zu NK-Zellen stellen $\gamma\delta$ -T-Zellen eine NK-Zell-ähnliche, "innate-like" (den Zellen des angeborenen Immunsystems gleichende) Untergruppe der T-Zellen dar. Sie scheinen dabei aber in der Evolution durch ihre vielseitigen Effektorfunktionen einen Vorteil gegenüber NK-Zellen gehabt zu haben und agierten dadurch erfolgreicher an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. $\gamma\delta$ -T-Zellen schlagen somit eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Durch die Verbesserung des Zytotoxizitäts-Assays und seine Anpassung an das Huhn war es möglich die Zytotoxizität der aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen zu untersuchen. Die zytotoxischen Fähigkeiten von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Huhn zeigten deutliche gewebeabhängige Unterschiede. Die $\gamma\delta$ -T-Zell-Population im peripheren Blut zeigt überhaupt keine Zytotoxizität, die der Splenozyten zu einem gewissen Maße und die stärkste zytolytische Aktivität wurde $\gamma\delta$ -T-Zellen der IEL-Population nachgewiesen. Die höchste spontane Zytotoxizität wurde entdeckt in der intestinalen $\gamma\delta$ -T-Zell-Population; diese war dabei vergleichbar mit der der intestinalen NK-Zell-Population. Die spontane Zytotoxizität von Splenozyten lässt sich durch die Kultivierung mit IL-2 und IL-12 deutlich steigern. Das stärkste zytolytische Potenzial geht von den CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen aus.

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit ergeben sich einige weitere Fragestellungen, die in folgenden Studien untersucht werden sollten. Durch Zytotoxizitäts-Assays mit weiteren Targetzelllinien und dem Einsatz von unterschiedlichen Antikörpern, bzw. der genaueren Charakterisierung des bereits eingesetzten Antikörpers 20E5, könnten neue Aussagen hinsichtlich der Zielzellerkennung bzw. der daran beteiligten Strukturen auf den $\gamma\delta$ -T-Zellen getroffen werden. Mittels $V\gamma$ -spezifischer Antikörper könnten zum einen die Gewebeverteilung bestimmter TCR-Typen im Huhn, zum anderen auch deren möglicherweise unterschiedlichen zytotoxischen Potenziale untersucht werden. Ob die Anwesenheit einer bestimmten CD8-Corezeptor-Form einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat, ließe sich mit Hilfe des Antikörpers EP-42 nachweisen. Da die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nur mit Zellen von gesunden Hühnern gleichen Alters durchgeführt wurden, wäre es interessant die Veränderungen der Zytotoxizität in bakteriellen, viralen und parasitären Infektionsmodellen sowie deren Altersabhängigkeit zu überprüfen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Spontane Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Haushuhn

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der zytotoxischen Fähigkeiten der $\gamma\delta$ -T-Zellen des Haushuhns.

Da im Haushuhn im Gegensatz zum Säuger nur niedrige Frequenzen an NK-Zellen in Geweben wie Milz und Lunge sowie dem Blut zu finden sind, dort aber zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde die spontane Zytotoxizität der beim Huhn in vielen Geweben vermehrt vorhandenen $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels durchflusszytometrischem Zytotoxizitäts-Assay untersucht. Durch die Anpassung des Zytotoxizitäts-Assays an Hühner- $\gamma\delta$ -T-Zellen als Effektorzellen und Hühner-Zielzellen wurde die Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der Zytotoxizität von aviären $\gamma\delta$ -T-Zellen verbessert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Lymphozyten, die aus dem Blut isoliert worden waren, keine spontane zytolytische Aktivität zeigten, die aus der Milz hingegen eine spezifische Zytotoxizität von bis zu 50% und die aus dem intestinalen Epithel von bis zu 85% vorwiesen.

Die Zytotoxizität der Splenozyten ließ sich mittels vorausgehender Stimulation mit dem Zytokin IL-2 steigern, durch die Stimulation mit der Kombination aus IL-2 und IL-12 sogar deutlich erhöhen. Die Zytotoxizität wurde gegenüber der klassischen Hühner-Zielzelllinie RP9 beobachtet, nicht jedoch gegenüber der Zelllinie CU24. Das zytolytische Potenzial der $\gamma\delta$ -T-Zellen ist dabei nicht MHC-abhängig, da die Effektorzellen mit B²B²-Hintergrund nicht nur die RP9-Zellen mit gleichem MHC-Hintergrund, sondern ebenso erfolgreich die neue Zielzelllinie 2D8 mit einem MHC-Hintergrund von B¹⁹B¹⁹ abtöten konnten. Durch die Auftrennung der Effektorzellen aus der Milz in verschiedene Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie vor deren Einsatz im Zytotoxizitäts-Assay, konnten die CD8 positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen als hauptsächlich zytolytisch aktive Subpopulation identifiziert werden. Sowohl CD8 negative $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch CD8 positive $\alpha\beta$ -T-Zellen zeigten jeweils nur ein geringes zytolytisches Potenzial. Unter den Lymphozyten des intestinalen Epithels wurden sowohl zytotoxische NK-Zellen als auch zytotoxische $\gamma\delta$ -T-Zellen gefunden.

Zusammenfassend repräsentieren $\gamma\delta$ -T-Zellen im Haushuhn eine wichtige spontan zytotoxische Zellpopulation in verschiedenen Geweben.

7 SUMMARY

Spontaneous cytotoxicity of chicken $\gamma\delta$ T cells

The aim of this study was to identify and characterize the cytotoxic potential of $\gamma\delta$ T cells in the chicken.

Compared to mammals, only low frequencies of NK cells are detectable in tissues like spleen, lung and blood in the chicken. Since cytotoxic activity was observed in these tissues in the absence of detectable NK cells the spontaneous cytotoxicity of chicken $\gamma\delta$ T cells, present in high numbers, was investigated in different tissues via the flow cytometric based cytotoxicity-assay. The optimization of this cytotoxicity-assay for chicken effector and target cells enabled the further exploration of the cytotoxic function of avian $\gamma\delta$ T cells. In lymphocytes isolated from chicken blood no spontaneous cytotoxicity was detectable, whereas specific cytotoxicity of up to 50% was observed in splenocytes and of up to 85% in intestinal epithelial lymphocytes.

The cytotoxicity of splenocytes was enhanced by preincubation with the cytokine IL-2, and strongly increased by the combination of IL-2 and IL-12. The cytotoxicity was observed against the prototypic chicken target cell line RP9 but not against the chicken cell line CU24. The cytolytic potential of $\gamma\delta$ T cells is not restricted to MHC as effector cells with a genetic MHC background of B²B² are able to kill the new target cell line 2D8 with a different MHC background of B¹⁹B¹⁹ in the same manner as RP9 cells with a matching MHC background. By cell sorting of splenocytes the CD8 positive $\gamma\delta$ T cells were identified as a major spontaneously cytolytic subpopulation. Both CD8 negative $\gamma\delta$ T cells and CD8 positive $\alpha\beta$ T cells showed only low cytotoxic potential. Within intestinal epithelial lymphocytes cytotoxic NK cells as well as cytotoxic $\gamma\delta$ T cells were observed.

In conclusion $\gamma\delta$ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in different tissues of the chicken.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. The Journal of Experimental Medicine, 1988. **167**(2): p. 315-322.
2. Neulen, M.-L. and T.W. Göbel, *Chicken CD56 defines NK cell subsets in embryonic spleen and lung*. Developmental & Comparative Immunology, 2012. **38**(3): p. 410-415.
3. Neulen, M.-L., et al., *Identification of novel chicken CD4+ CD3- blood population with NK cell like features*. Developmental & Comparative Immunology, 2015. **49**(1): p. 72-78.
4. Phillips, J.H., et al., *Evidence that the T cell antigen receptor may not be involved in cytotoxicity mediated by gamma/delta and alpha/beta thymic cell lines*. The Journal of Experimental Medicine, 1987. **166**(5): p. 1579-1584.
5. Borst, J., et al., *A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 683-8.
6. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond*. Annual Review of Immunology, 2014. **32**: p. 121-55.
7. Janeway, C.A., B. Jones, and A. Hayday, *Specificity and function of T cells bearing $\gamma\delta$ receptors*. Immunology Today, 1988. **9**(3): p. 73-76.
8. Statistisches Bundesamt, *19 Land- und Forstwirtschaft*, in *Statistisches Jahrbuch 2016*, I. Willand, Editor. 2016, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden. p. 493.
9. Statistisches Bundesamt, *6 Einkommen, Konsum, Lebensbedingungen*, in *Statistisches Jahrbuch 2016*, I. Willand, Editor. 2016, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden. p. 177.
10. ZDGZentralverbandderDeutschenGeflügelwirtschaft e.V. *Wirtschaftszahlen*. 2017 [09.08.2017]; Available from: <https://www.gefluegelcharta.de/infopool/wirtschaftszahlen/>.
11. TheGlobalConsortiumforH5N8andRelatedInfluenzaViruses, *Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8*. Science, 2016. **354**(6309): p. 213-217.
12. Adlhoch C, G.C., Koch G, Brown I, Bouwstra R, Verdonck F, Penttinen P, Harder T, *Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005*. Eurosurveillance, 2014. **19**(50): p. 20996.

13. Michael, C.A., D. Dominey-Howes, and M. Labbate, *The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management*. Frontiers in Public Health, 2014. **2**: p. 145.
14. Marshall, B.M. and S.B. Levy, *Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health*. Clinical Microbiology Reviews, 2011. **24**(4): p. 718-733.
15. Davison, F., *Chapter 1 - The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features* A2 - Schat, Karel A, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 1-9.
16. Murphy, J.B., *THE EFFECT OF ADULT CHICKEN ORGAN GRAFTS ON THE CHICK EMBRYO*. The Journal of Experimental Medicine, 1916. **24**(1): p. 1-5.
17. Silverstein, A.M., *The lymphocyte in immunology: from James B. Murphy to James L. Gowans*. Nature Immunology, 2001. **2**(7): p. 569-571.
18. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The Bursa of Fabricius and Antibody Production*. Poultry Science, 1956. **35**(1): p. 224-225.
19. Cooper, M.D., R.D.A. Peterson, and R.A. Good, *Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken*. Nature, 1965. **205**(4967): p. 143-146.
20. Pasteur, L., *De l'atténuation du virus du choléra des poules*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, 1880. **91**: p. 673-680.
21. InternationalChickenGenomeSequencingConsortium, *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
22. Sharma, J.M., *Embryo Vaccination with Infectious Bursal Disease Virus Alone or in Combination with Marek's Disease Vaccine*. Avian Diseases, 1985. **29**(4): p. 1155-1169.
23. Brenner, M.B., et al., *Identification of a putative second T-cell receptor*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 145-149.
24. Brenner, M.B., et al., *Two forms of the T-cell receptor γ protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 689-694.
25. Garboczi, D.N., et al., *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 134-141.
26. Allison, T.J. and D.N. Garboczi, *Structure of $\gamma\delta$ T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens*. Molecular Immunology, 2002. **38**(14): p. 1051-1061.
27. Smith, A.L. and T.W. Göbel, *Chapter 5 - Avian T Cells: Antigen Recognition and*

- Lineages A2 - Schat, Karel A, in Avian Immunology (Second Edition), B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 91-102.*
28. Carding, S.R. and P.J. Egan, *$\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity.* Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(5): p. 336-345.
 29. Meuer, S.C., et al., *Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex.* The Journal of Experimental Medicine, 1983. **157**(2): p. 705-719.
 30. Allison, J.P., B.W. McIntyre, and D. Bloch, *Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody.* The Journal of Immunology, 1982. **129**(5): p. 2293-2300.
 31. Reinherz, E.L., et al., *Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex.* Cell, 1982. **30**(3): p. 735-743.
 32. Groh, V., et al., *Human lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system.* The Journal of Experimental Medicine, 1989. **169**(4): p. 1277-94.
 33. Parker, C.M., et al., *Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor $\gamma\delta$ repertoire.* The Journal of Experimental Medicine, 1990. **171**(5): p. 1597-1612.
 34. Itohara, S., et al., *Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia.* Nature, 1990. **343**(6260): p. 754-757.
 35. Havran, W.L. and J.P. Allison, *Origin of Thy-1+ dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors.* Nature, 1990. **344**(6261): p. 68-70.
 36. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, *$\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.* Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(7): p. 467-478.
 37. Mackay, C.R. and W.R. Hein, *A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype.* International Immunology, 1989. **1**(5): p. 540-5.
 38. Davis, W.C., et al., *Analysis of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TcR.* Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996. **52**(4): p. 275-283.
 39. Outteridge, P.M., R.M. Binns, and S.T. Licence, *Subpopulations of pig blood E-rosette-forming lymphocytes and thymus-dependent null cells: separation by nylon wool columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and antigen responsiveness.* International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1982. **67**(1): p. 18-24.
 40. Davis, W.C., et al., *Analysis of monoclonal antibodies reacting with molecules*

- expressed on $\gamma\delta$ T-cells*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001. **80**(1): p. 53-62.
41. Mackay, C.R., M.-F. Beya, and P. Matzinger, *$\gamma\delta$ T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development*. European Journal of Immunology, 1989. **19**(8): p. 1477-1483.
 42. Hein, W.R. and C.R. Mackay, *Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system*. Immunology Today, 1991. **12**(1): p. 30-4.
 43. Caro, M.R., et al., *Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat*. Research in Veterinary Science, 1998. **65**(2): p. 145-148.
 44. Faldyna, M., et al., *Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001. **82**(1-2): p. 23-37.
 45. Xiong, X., et al., *Identification of guinea pig gammadelta T cells and characterization during pulmonary tuberculosis*. Veterinary Immunology and Immunopathology 2004. **102**(1-2): p. 33-44.
 46. Shekhar, S., S. Milling, and X. Yang, *Migration of $\gamma\delta$ T cells in steady-state conditions*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012. **147**(1-2): p. 1-5.
 47. Conrad, M.L., W.C. Davis, and B.F. Koop, *TCR and CD3 antibody cross-reactivity in 44 species*. Cytometry Part A, 2007. **71A**(11): p. 925-933.
 48. Waters, W.R., et al., *ANALYSIS OF MITOGEN-STIMULATED LYMPHOCYTE SUBSET PROLIFERATION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF CAPTIVE ELK (CERVUS ELAPHUS)*. Journal of Wildlife Diseases, 2002. **38**(2): p. 344-351.
 49. Shortman, K. and L. Wu, *Early T Lymphocyte Progenitors*. Annual Review of Immunology, 1996. **14**(1): p. 29-47.
 50. Ciofani, M., et al., *Stage-Specific and Differential Notch Dependency at the $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Lineage Bifurcation*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 105-116.
 51. Anderson, G., et al., *Cellular Interactions in Thymocyte Development*. Annual Review of Immunology, 1996. **14**(1): p. 73-99.
 52. Murphy, K., *Chapter 8: The Development and Survival of Lymphocytes*, in *Janeway's Immunobiology*, D. Schanck, Editor. 2012, Garland Science: New York. p. 290-305.
 53. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and*

- negative selection in the thymus*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 100-103.
54. Livák, F., et al., *Characterization of TCR Gene Rearrangements During Adult Murine T Cell Development*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(5): p. 2575-2580.
 55. Xiong, N. and D.H. Raulet, *Development and selection of $\gamma\delta$ T cells*. Immunological Reviews, 2007. **215**(1): p. 15-31.
 56. Dunon, D., et al., *Ontogeny of the Immune System: $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T Cells Migrate from Thymus to the Periphery in Alternating Waves*. The Journal of Experimental Medicine, 1997. **186**(7): p. 977-988.
 57. Haas, W., P. Pereira, and S. Tonegawa, *Gamma/Delta Cells*. Annual Review of Immunology, 1993. **11**(1): p. 637-685.
 58. Schild, H., et al., *The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells*. Cell, 1994. **76**(1): p. 29-37.
 59. Munk, M.E., A.J. Gatrill, and S.H. Kaufmann, *Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria*. The Journal of Immunology, 1990. **145**(8): p. 2434-2439.
 60. Balbi, B., et al., *T-Lymphocytes with $\gamma\delta$ + V δ 2+ Antigen Receptors Are Present in Increased Proportions in a Fraction of Patients with Tuberculosis or with Sarcoidosis*. American Review of Respiratory Disease, 1993. **148**(6_pt_1): p. 1685-1690.
 61. Ferrick, D.A., et al., *Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 255-257.
 62. Wucherpfennig, K.W., et al., *Gamma delta T-cell repertoire in acute multiple sclerosis lesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(10): p. 4588-4592.
 63. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-294.
 64. Fahrner, A.M., et al., *Attributes of $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(18): p. 10261-10266.
 65. Dalton, J.E., et al., *Intraepithelial $\gamma\delta$ +Lymphocytes Maintain the Integrity of Intestinal Epithelial Tight Junctions in Response to Infection*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 818-829.
 66. Ismail, A.S., et al., *$\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-*

- microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(21): p. 8743-8748.
67. Saito, H., et al., *Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences*. Nature, 1984. **309**(5971): p. 757-62.
68. Chien, Y.H., et al., *A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation*. Nature, 1987. **327**(6124): p. 677-82.
69. Klausner, R.D., J. Lippincott-Schwartz, and J.S. Bonifacino, *The T Cell Antigen Receptor: Insights into Organelle Biology*. Annual Review of Cell Biology, 1990. **6**(1): p. 403-431.
70. Göbel, T.W.F. and L. Bolliger, *Evolution of the T Cell Receptor Signal Transduction Units*, in *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*, L. Du Pasquier and G.W. Litman, Editors. 2000, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 303-320.
71. Göbel, T.W.F. and J.-P. Dangy, *Evidence for a Stepwise Evolution of the CD3 Family*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(2): p. 879-883.
72. Francis Elliott, J., et al., *The adult T-cell receptor δ -chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes*. Nature, 1988. **331**(6157): p. 627-631.
73. Quertermous, T., et al., *Human T-cell γ genes contain N segments and have marked junctional variability*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 184-187.
74. Asarnow, D.M., et al., *Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells*. Cell, 1988. **55**(5): p. 837-847.
75. Piriou-Guzylack, L. and H. Salmon, *Membrane markers of the immune cells in swine: an update*. Veterinary Research, 2008. **39**(6): p. 54.
76. Bucy, R.P., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Ontogeny of T cell receptors in the chicken thymus*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(4): p. 1161-1168.
77. Bucy, R.P., et al., *Avian T cells expressing $\gamma\delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium*. The Journal of Immunology, 1988. **141**(7): p. 2200-2205.
78. Allison, J.P. and L.L. Lanier, *Structure, Function, and Serology of the T-Cell Antigen Receptor Complex*. Annual Review of Immunology, 1987. **5**(1): p. 503-540.
79. Kuziel, W.A., et al., *Regulation of T-cell receptor γ -chain RNA expression in murine Thy-1+ dendritic epidermal cells*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 263-266.

80. Arstila, T.P. and O. Lassila, *Androgen-induced expression of the peripheral blood $\gamma\delta$ T cell population in the chicken*. The Journal of Immunology, 1993. **151**(12): p. 6627-6633.
81. Tregaskes, C.A., et al., *Identification and analysis of the expression of CD8 $\alpha\beta$ and CD8 $\alpha\alpha$ isoforms in chickens reveals a major TCR- $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\beta$ subset of intestinal intraepithelial lymphocytes*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(9): p. 4485-4494.
82. Dunon, D., M.D. Cooper, and B.A. Imhof, *Thymic origin of embryonic intestinal $\gamma\delta$ T cells*. Journal of Experimental Medicine, 1993. **177**(2): p. 257-63.
83. Cooper, M.D., et al., *Avian T Cell Ontogeny*. Advances in Immunology, 1991. **50**: p. 87-117.
84. Coltey, M., F.V. Jotereau, and N.M. Le Douarin, *Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus*. Cell Differentiation, 1987. **22**(1): p. 71-82.
85. Coltey, M., et al., *Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras*. The Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**(2): p. 543-557.
86. Dunon, D., et al., *Quantification of T-Cell Progenitors During Ontogeny: Thymus Colonization Depends on Blood Delivery of Progenitors*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2234-2243.
87. Penit, C., F. Jotereau, and M.J. Gelabert, *Relationships between terminal transferase expression, stem cell colonization, and thymic maturation in the avian embryo: studies in thymic chimeras resulting from homospecific and heterospecific grafts*. The Journal of Immunology, 1985. **134**(4): p. 2149-2154.
88. Chen, C.H., et al., *Differential expression of two t cell receptors, tcr1 and tcr2, on chicken lymphocytes*. European Journal of Immunology, 1988. **18**(4): p. 539-544.
89. Chen, C.H., et al., *TCR3: a third T-cell receptor in the chicken*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(7): p. 2351-2355.
90. Cooper, M.D., et al., *T-cell development in birds*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1989. **54 Pt 1**: p. 69-73.
91. Berndt, A. and U. Methner, *Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated Salmonella typhimurium strains*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001. **78**(2): p. 143-161.
92. Berndt, A., J. Pieper, and U. Methner, *Circulating $\gamma\delta$ T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens*. Infection and

- Immunity, 2006. **74**(7): p. 3967-3978.
93. Lillehoj, H.S., *Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis*. Research in Veterinary Science, 1994. **56**(1): p. 1-7.
 94. Sanchez-Garcia, F.J. and W.T. McCormack, *Chicken gamma delta T cells*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1996. **212**: p. 55-69.
 95. Kasahara, Y., C.-L.H. Chen, and M.D. Cooper, *Growth requirements for avian $\gamma\delta$ T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming*. European Journal of Immunology, 1993. **23**(9): p. 2230-2236.
 96. Tsuji, S., et al., *$\gamma\delta$ T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(2): p. 420-427.
 97. Malissen, B., et al., *Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development*. Advances in Immunology, 1999. **72**: p. 103-48.
 98. Göbel, T.W.F. and M. Fluri, *Identification and analysis of the chicken CD3 ϵ gene*. European Journal of Immunology, 1997. **27**(1): p. 194-198.
 99. Bernot, A. and C. Auffray, *Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(6): p. 2550-2554.
 100. Kubota, T., et al., *Characterization of an Avian (Gallus gallus domesticus) TCR $\alpha\delta$ Gene Locus*. The Journal of Immunology, 1999. **163**(7): p. 3858-3866.
 101. Parra, Z.E. and R.D. Miller, *Comparative analysis of the chicken TCRalpha/delta locus*. Immunogenetics, 2012. **64**(8): p. 641-5.
 102. Parra, Z.E., et al., *A Second TCR δ Locus in Galliformes Uses Antibody-like V Domains: Insight into the Evolution of TCR δ and TCR μ Genes in Tetrapods*. The Journal of Immunology, 2012. **188**(8): p. 3912-3919.
 103. Six, A., et al., *Characterization of avian T-cell receptor γ genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(26): p. 15329-15334.
 104. Gumperz, J.E. and P. Parham, *The enigma of the natural killer cell*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 245-8.
 105. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: Multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation*. Immunology and Cell Biology, 1993. **71**(3): p. 201-208.

106. Ju, S.-T., et al., *Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation*. Nature, 1995. **373**(6513): p. 444-448.
107. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunology Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
108. Colonna, M., *Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors*. Immunological Reviews, 1997. **155**(1): p. 127-133.
109. Gobel, T.W., B. Kaspers, and M. Stangassinger, *NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken*. International Immunology, 2001. **13**(6): p. 757-62.
110. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nature Immunology, 2008. **9**(5): p. 503-510.
111. Trinchieri, G., *Biology of Natural Killer Cells*. Advances in Immunology, 1989. **47**: p. 187-376.
112. Goodman, T. and L. Lefrancois, *Intraepithelial lymphocytes. Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function*. The Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**(5): p. 1569-1581.
113. Qin, G., et al., *Phosphoantigen-Expanded Human $\gamma\delta$ T Cells Display Potent Cytotoxicity against Monocyte-Derived Macrophages Infected with Human and Avian Influenza Viruses*. The Journal of Infectious Diseases, 2009. **200**(6): p. 858-865.
114. Dieli, F., et al., *Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular Mycobacterium tuberculosis by V γ 9/V δ 2 T Lymphocytes*. The Journal of Infectious Diseases, 2001. **184**(8): p. 1082-1085.
115. Dudal, S., et al., *Release of LL-37 by Activated Human V γ 9V δ 2 T Cells: A Microbicidal Weapon against Brucella suis*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(8): p. 5533-5539.
116. Hamada, S., et al., *IL-17A Produced by $\gamma\delta$ T Cells Plays a Critical Role in Innate Immunity against Listeria monocytogenes Infection in the Liver*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(5): p. 3456-3463.
117. Sharma, J.M., *Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens*. Avian Diseases, 1981. **25**(4): p. 882-93.
118. Göbel, T.W.F., et al., *Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(7): p. 1685-1691.

119. Chai, J.Y. and H.S. Lillehoj, *Isolation and functional characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumour target cells*. Immunology, 1988. **63**(1): p. 111-117.
120. Jansen, C.A., et al., *Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells*. Developmental & Comparative Immunology, 2010. **34**(7): p. 759-767.
121. Choi, K.D. and H.S. Lillehoj, *Role of chicken IL-2 on $\gamma\delta$ T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and $\gamma\delta$ T-cells*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000. **73**(3): p. 309-321.
122. Lillehoj, H.S., *Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to eimerian infections in inbred chickens*. Infection and Immunity, 1989. **57**(7): p. 1879-1884.
123. Rogers, S.L., et al., *Avian NK activities, cells and receptors*. Seminars in Immunology, 2008. **20**(6): p. 353-60.
124. Viertlboeck, B.C., et al., *Chicken C-type lectin-like receptor B-NK, expressed on NK and T cell subsets, binds to a ligand on activated splenocytes*. Molecular Immunology, 2008. **45**(5): p. 1398-1404.
125. Zechmann, M., S. Reese, and T.W. Gobel, *Chicken CRTAM binds nectin-like 2 ligand and is upregulated on CD8+ $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes with different kinetics*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81942.
126. Rouvier, E., M.-F. Luciani, and P. Golstein, *Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell-mediated cytotoxicity*. The Journal of Experimental Medicine, 1993. **177**(1): p. 195-200.
127. Mattarollo, S.R., et al., *Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to $V\gamma 9V\delta 2$ T cell cytotoxicity*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2007. **56**(8): p. 1285-1297.
128. Acha-Orbea, H., et al., *Inhibition of lymphocyte mediated cytotoxicity by perforin antisense oligonucleotides*. The EMBO Journal, 1990. **9**(12): p. 3815-3819.
129. Blumberman, S.L., et al., *Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ $\gamma\delta$ and CD4+ $\alpha\beta$ T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen*. Molecular Immunology, 2007. **44**(8): p. 2023-2035.
130. Poggi, A., et al., *Gammadelta T Lymphocytes Producing IFN γ and IL-17 in Response to Candida Albicans or Mycobacterial Antigens: Possible Implications for Acute and Chronic Inflammation*. Current Medicinal Chemistry, 2009. **16**(35): p. 4743-4749.
131. Shibata, K., et al., *IFN- γ -producing and IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus*. The Journal of Immunology,

2014. **192**(5): p. 2210-8.
132. Endsley, J.J., et al., *Characterization of Bovine Homologues of Granulysin and NK-lysin*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(4): p. 2607-2614.
133. Alvarez, A.J., et al., *WCI+ $\gamma\delta$ T Cells Indirectly Regulate Chemokine Production During Mycobacterium bovis Infection in SCID-bo Mice*. Transboundary and Emerging Diseases, 2009. **56**(6-7): p. 275-284.
134. Guzman, E., et al., *Bovine $\gamma\delta$ T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012. **148**(1-2): p. 161-7.
135. Graham, E.M., et al., *Natural killer cell number and phenotype in bovine peripheral blood is influenced by age*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009. **132**(2): p. 101-108.
136. Pauly, T., et al., *Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes*. Immunology, 1996. **88**(2): p. 238-246.
137. Hintz, M., et al., *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in Escherichia coli*. FEBS Letters, 2001. **509**(2): p. 317-322.
138. Eisenreich, W., et al., *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004. **61**(12): p. 1401-1426.
139. Kabelitz, D., *Small molecules for the activation of human gammadelta T cell responses against infection*. Recent Patents on Antiinfective Drug Discovery, 2008. **3**(1): p. 1-9.
140. Born, W.K., et al., *Hybridomas Expressing $\gamma\delta$ T-Cell Receptors Respond to Cardiolipin and β 2-Glycoprotein 1 (Apolipoprotein H)*. Scandinavian Journal of Immunology, 2003. **58**(3): p. 374-381.
141. Nazerian, K., *An updated list of avian cell lines and transplantable tumours*. Avian Pathology, 1987. **16**(3): p. 527-44.
142. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon- γ* . Journal of Immunological Methods, 2003. **274**(1-2): p. 229-232.
143. Jarosinski, K.W., et al., *Marek's disease virus: lytic replication, oncogenesis and control*. Expert Review of Vaccines, 2006. **5**(6): p. 761-772.
144. Brunner, K.T., et al., *Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells of (51)Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody*

- and by drugs*. Immunology, 1968. **14**(2): p. 181-196.
145. Piriou, L., et al., *Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species*. Cytometry, 2000. **41**(4): p. 289-97.
146. Malyguine, A., et al., *Study of diverse mechanisms of cell-mediated cytotoxicity in gene-targeted mice using flow cytometric cytotoxicity assay*. Immunology Letters, 2002. **83**(1): p. 55-59.
147. Huhle, D., S. Hirmer, and T.W. Göbel, *Splenic $\gamma\delta$ T cell subsets can be separated by a novel mab specific for two CD45 isoforms*. Developmental & Comparative Immunology, 2017. **77**: p. 229-240.
148. Merkle, H., J. Cihak, and U. Lösch, *The cytotoxic T lymphocyte response in reticuloendotheliosis virus-infected chickens is mediated by $\alpha\beta$ and not by $\gamma\delta$ T cells*. Immunobiology, 1992. **186**(3): p. 292-303.
149. Dyugovskaya, L., M. Hirsh, and H. Ginsburg, *Phenotypic profile and functional characterization of rat lymph node-derived $\gamma\delta$ T cells: implication in the immune response to cytomegalovirus*. Immunology, 2003. **108**(2): p. 129-136.
150. Yin, W., et al., *Functional dichotomy of V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in chronic hepatitis C virus infections: role in cytotoxicity but not for IFN- γ production*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 26296.
151. Pieper, J., U. Methner, and A. Berndt, *Heterogeneity of avian $\gamma\delta$ T cells*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008. **124**(3-4): p. 241-52.
152. Grimm, E.A., et al., *Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 1982. **155**(6): p. 1823-1841.
153. Marçais, A., et al., *Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines*. Frontiers in Immunology, 2013. **4**: p. 450.
154. Lee, S.-H., M.F. Fragoso, and C.A. Biron, *A Novel Mechanism Bridging Innate and Adaptive Immunity: IL-12 Induction of CD25 to Form High Affinity IL-2 Receptors on NK Cells*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(6): p. 2712-2716.
155. Nelson, B.H. and D.M. Willerford, *Biology of the interleukin-2 receptor*. Advances in Immunology, 1998. **70**: p. 1-81.
156. Murphy, K., *Chapter 9: T Cell-Mediated Immunity*, in *Janeway's Immunobiology*, D. Schanck, Editor. 2012, Garland Science: New York. p. 353-365.
157. Ferrarini, M., et al., *Human $\gamma\delta$ T cells: a nonredundant system in the immune-*

-
- surveillance against cancer*. Trends in Immunology, 2002. **23**(1): p. 14-18.
158. Wilhelm, M., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells*. Journal of Translational Medicine, 2014. **12**(1): p. 45.
159. Dieli, F., et al., *Targeting Human $\gamma\delta$ T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer*. Cancer Research, 2007. **67**(15): p. 7450-7457.

9 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Göbel, der es mir ermöglicht hat in seinem Labor und unter seiner Leitung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Seine hervorragende fachliche Kompetenz, seine großartige Betreuung und seine zuverlässige menschliche Unterstützung hatten einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ich möchte außerdem Frau PD Dr. Birgit Viertlböck, Frau PD Dr. Sonja Härtle und Herrn Prof. Dr. Kaspers danken für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen. Ihre kritischen Beiträge und ihr kompetenter Rat waren eine große Bereicherung für meine Arbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Deeg und Kaspers danke ich für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön gilt Sieglinde Hirmer, Marina Kohn und Beatrice Schäfer für ihre stete Hilfsbereitschaft und lehrreiche Unterstützung in verschiedensten Bereichen.

Für die gute Betreuung der Tiere und die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Daniela Hölle und Thomas Hoschka bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe, die mich vom ersten Tag an freundlich aufgenommen und eingearbeitet hat und für ein wunderbares Arbeitsklima mit vielen lustigen Momenten gesorgt hat. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Marie-Luise Neulen bedanken für ihre motivierende Betreuung im vorrausgegangenen Praktikum, in dem meine Begeisterung für die Immunologie geweckt wurde. Sowohl ihre freundliche Einarbeitung als auch ihre kollegiale Zusammenarbeit während der Doktorarbeit haben maßgeblich zum Erfolg beigetragen. Meinen Kolleginnen Daniela Huhle, Stephanie Scherer und Isabelle Walliser danke ich für eine harmonische Zusammenarbeit im Labor und ihre freundschaftliche Unterstützung.

Bei meinen lieben Freunden Emmelie Witt, Carolin Feicht, Florian Feicht und Steffi Wernetshammer bedanke ich mich für ihre ständige Bereitschaft mir zur Seite zu stehen und bei mir auch in stressigen Phasen mit positiver Energie und vielseitiger Ablenkung für Aufmunterung zu sorgen.

Besonders bedanke ich mich bei meiner Schwester Lena Fenzl, die mich in jeder Situation loyal unterstützt und mir immer einen Rückhalt geboten hat. Ihre familiäre

Freundschaft hat mir in vielen Situationen sehr geholfen.

Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern Monika Aumiller und Klaus Fenzl, die mich mein Leben lang vorbehaltlos unterstützt haben, vertrauensvoll an mich geglaubt haben und es mir in jeder Hinsicht ermöglicht haben meine Träume zu realisieren.